Leiden 1936

HET ONDERZOEK VAN DE ANTITUBERCULEUZE EIGENSCHAPPEN VAN CHEMISCHE VERBINDINGEN MET BEHULP VAN HET INTRAVENEUS GEINFECTEERDE KIPPENEMBRYO

STANFORD LANE MEDICAL
LIBRARY SAN FRANCISCO

W. G. LINSCHEER

HET ONDERZOEK VAN DE ANTITUBERCULEUZE EIGENSCHAPPEN VAN CHEMISCHE VERBINDINGEN MET BEHULP VAN HET INTRAVENEUS GEINFECTEERDE KIPPENEMBRYO

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
Dr. A. E. VAN ARKEL, HOOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE
FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 27 JUNI 1956
TE 15 UUR

DOOR

WILLEM GIJSBERTUS LINSCHEER
GEBOREN TE LEIDEN IN 1924

UITGEVERIJ EXCELSIOR - ORANJEPLEIN 96 - 'S-GRAVENHAGE

Promotor: Prof. Dr J. Mulder

De onderzoekingen vermeld in deze dissertatie werden verricht in de afdeling voor Interne Geneeskunde te Leiden en in het Oude en Nieuwe Gasthuis te Zutphen in nauwe samenwerking met Dr A.J.Ch.Haex en met financiële steun van de N.V. Kon. Pharmaceutische Fabrieken v/h Brocades-Stheeman & Pharmacia. Ook werd een bijdrage ontvangen van het Jan Dekker Fonds en het Curaçao Fonds. De onderzochte verbindingen werden gesynthetiseerd door de Researchafdeling van de N.V. onder leiding van Prof. Dr W. Th. Nauta en gratis ter onzer beschikking gesteld.

Van de medewerkers wil ik Dr A.J.Ch.Haex in het bijzonder dank zeggen voor zijn aandeel in dit onderzoek. Verder ben ik de heer R.J.Versteegh, arts te Leiden, zeer erkentelijk voor de wijze, waarop hij heeft meegewerkt aan de uitvoering van de experimenten. Door zijn noeste vlijt en zijn nauwgezette arbeid heeft hij er veel toe bijgedragen de kippenembryoproef als routinemethode in praktijk te brengen. Hetzelfde geldt voor de overige medewerkers, die bij de uitvoering van de experimenten waren betrokken. Ik ben hun grote dank verschuldigd voor de vele opofferingen, die zij zich hebben getroost.

De statistische bewerking van de resultaten door de heer C.A.G. Nass, hoofd van de afdeling Statistiek van het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden, heeft geleid tot een vereenvoudiging van de proefopstelling. Ik ben hem zeer dankbaar voor de wijze, waarop hij zich geheel belangeloos van zijn taak heeft gekweten, waarbij het voor hem noodzakelijk was geheel nieuwe wegen te bewandelen.

INHOUD

Inleiding 7

Literatuur 8

Methode 9

Resultaten 16

A. Het onderzoek van clinisch toegepaste tuberculostatica 16
B. Het onderzoek van nieuwe of weinig bekende tuberculostatica 18
C. Bespreking van de resultaten 19
D. Het verband tussen het miltgewicht en de microscopisch waarneembare tuberculeuze afwijkingen 21

Samenvatting en Conclusies 26

Summary and Conclusions 27

Résumé et conclusions 28

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen 29

Literatuurlijst 30

Tabellen 33

Foto's en Figuren 55

Voortgezet statistisch onderzoek

INLEIDING

Hoewel de chemotherapie bij de behandeling van de tuberculose van grote betekenis is geworden, wordt of blijft het ziektebeeld vaak chronisch, omdat geen volledige sterilisatie van de haarden kan worden verkregen. Resistentie van de tuberkelbacterie tegen de gebruikte middelen en intoxicaties door deze middelen zijn dan vaak het gevolg. Nieuwe en betere verbindingen moeten hier de oplossing brengen. Daartoe is het noodzakelijk nieuwe stoffen in het laboratorium op hun mogelijke antibacteriële eigenschappen te onderzoeken.

Wanneer de chemicus zijn producten aan het biologisch laboratorium overdraagt, begint een lange reeks van moeizame en dikwijls tijdrovende experimenten, waarbij de stoffen steeds verder geselecteerd worden. In de meeste laboratoria begint men met het onderzoek in vitro, waarop dierexperimenten volgen. Laatstgenoemde proeven zijn zeer bewerkelijk. Helaas heeft het in vitro-experiment, als voor-selectiemethode, slechts een betrekkelijk geringe waarde. Slechts een zeer kleine fractie van de in vitro werkzaam bevonden stoffen voldoet in de dierproef. Ook heeft men waargenomen, dat in vitro onwerkzame of weinig werkzame verbindingen wel degelijk werkzaam kunnen zijn in de muis- en caviaproef. Ook de potentiëring van verschillende geneesmiddelen kan men het beste door middel van dierproeven toetsen. Er is dus behoefte aan een betere en snelle selectieproef, die aan het dierexperiment voorafgaat.

In ons laboratorium hebben wij getracht dit probleem op te lossen door een kortdurend in vivo experiment, de zgn. kippenembryoproef. Bij deze methode, die door Lee en Stavitsky in 1946 voor het eerst werd beschreven, wordt het kippenembryo intraveneus ingespoten met tuberkelbacteriën. Wanneer het ziektebeeld zich ongestoord kan ontwikkelen, ontstaat er een gegeneraliseerde orgaantuberculose. Dient men echter na de infectie een goed werkzame verbinding, zoals para-aminosalicylzuur (P. A. S.) of streptomycine toe, dan wordt de ontwikkeling van het ziekteproces geremd. Op deze wijze kan men een studie maken van het tuberculostatisch of tuberculocide vermogen van stoffen in een levend organisme. Tegelijkertijd orienteert men zich in deze proef over de toxiciteit van de betrokken verbinding.

In dit proefschrift wordt deze methode aan de hand van de verkregen resultaten besproken.

LITERATUUR

Over het gebruik van het kippenembryo voor de bestudering van de chemotherapeutische en bacteriologische problemen op het gebied van de tuberculose zijn vooral gedurende de Tweede Wereldoorlog nadere mededelingen verschenen [1]. De onderzoekers Emmart en Smith, Moor, Fite en Olson entten tuberkelbacteriën van bovine, humane en aviaire oorsprong op de vrijgeprepareerde chorio-allantois membraan of spoten de bacteriën in de allantoïsholte of in de dooierzak. Zij zagen bij al deze behandelingen ter plaatse tuberkelachtige infiltraten ontstaan. Wanneer men het ei aldus infecteert, treedt er in hoofdzaak een extra-embryonaal gelocaliseerd proces op met sporadische verspreiding in de parenchymateuze organen. Emmart en Smith werkten de eerstgenoemde methode reeds in 1941 uit voor chemotherapeutische doeleinden.

In de loop van hun onderzoekingen betreffende bepaalde verbindingen met tuberculostatische eigenschappen kwam het Lee en Stavitsky gewenst voor, het embryo zelf te infecteren. Zij meenden dit doel te kunnen bereiken door tuberkelbacteriën in een bloedvaatje van de chorio-allantois membraan te spuiten. Zij hadden reeds voordien, in 1946, een techniek beschreven voor het intraveneus inspuiten van kippenembryonen met chemotherapeutica, een methode, die, zij het met enkele verschillen, vroeger door Polk en medewerkers in 1938 wereldkundig was gemaakt. Bij de bespreking van de techniek zal er gelegenheid zijn, nader in te gaan op de details van hun methode en de verschillen kunnen dan worden aangegeven. Wij willen hier slechts nog vermelden, dat deze onderzoekers niet alleen uitkomsten publiceerden over de concentratie van de toegepaste chemotherapeutica in de weefselvochten gedurende een bepaalde periode, maar ook de resultaten betreffende het tuberculostatisch vermogen van promine, furacine, diasone en streptomycine, waaruit bleek, dat slechts het laatstgenoemde middel goede resultaten gaf.

Geheel andere wegen hebben tot deze studie geleid.

Dr A.J.Ch.Haex, die zijn medewerking verleende bij ons onderzoek, kon, in samenwerking met Mej. C.v.Beek, door systematische toepassing van de aspiratieleverbiopsie bij lijders aan verschillende vormen van tuberculose aantonen, dat een actieve haard in de meeste gevallen aanleiding geeft tot haematogene verspreiding. Histologisch serie-onderzoek van het gepuncteerde leverweefsel gaf verschillende typen van tuberkelstructuren te zien.

Ofschoon men door deze studie als waarschijnlijk kon aannemen, dat deze structuren zeer dikwijls van tuberculeuze genese waren (Van Beek en Haex), was het toch niet mogelijk om op deze wijze zekerheid te verkrijgen, daar de kweek- en caviaproeven van het leverweefsel dikwijls negatief bleven. Door kippenembryonen intraveneus met tuberkelbacterien te infecteren, werd getracht een haematogene uitzaaiing na te bootsen. Toen zich hierop een ernstige diffuse gegeneraliseerde tuberculose ontwikkelde, bleek het niet goed mogelijk de kleine tuberkels, die men zo vaak in de menselijke lever kan vinden, op te sporen. Om het proces te mitigeren, werd besloten streptomycine toe te passen.

Toen bleek, dat het streptomycine de ontwikkeling van het tuberculeuze proces sterk beperkte, kwam de gedachte naar voren om te trachten op deze wijze het tuberculostatisch vermogen van de toegevoegde stoffen min of meer te meten. Eerst in dit stadium van de onderzoekingen namen wij kennis van de studies van H.Lee, Stavitsky en M.Lee, die zich reeds geruime tijd met hetzelfde onderwerp bezig hielden. Zij hebben het rechtstreeks via de studie van chemotherapeutische vraagstukken benaderd.

1) Van hen, die de oudere onderzoekingen hebben gedaan, hebben vooral Mafucci en M.Koch en medewerkers bekendheid gekregen.

Methode

Daar de opgedane ervaringen in grote lijnen overeenkwamen met de gegevens van de hiervoren genoemde auteurs, werd besloten te trachten de methode als routine-methode uit te werken. Enkele verschilpunten in de uitvoering van de techniek worden in tabel I aangegeven. In verband met de oorspronkelijke vraagstelling was de aandacht aanvankelijk uitsluitend op de lever gericht. Dit orgaan leent zich uitstekend voor histologisch onderzoek. De haematogene infectie veroorzaakt in dit orgaan een diffuus verspreid tuberculeus proces, dat gemakkelijk van het omringende leverweefsel is te onderscheiden. De macroscopisch waarneembare afwijkingen blijken zich echter te beperken tot een geringe vermeerdering in grootte met sporadisch zichtbare necrosehaardjes. Voor een snelle beoordeling van de werking van chemotherapeutische middelen was het gewenst een orgaan te vinden met duidelijk waarneembare macroscopische afwijkingen. Reeds spoedig bleek de milt uitstekend geschikt te zijn voor dit doel, daar zij reeds 9 dagen na het plaatsvinden van de infectie dusdanig zwelt, dat zij 4 à 5 maal in gewicht toeneemt. Zichtbare necrotische haardjes zijn ook hier geen ongewoon verschijnsel. Worden de milten microscopisch onderzocht, dan blijken de histologische bevindingen met de macroscopische verschijnselen in overeenstemming te zijn. (Zie de resultaten van het histologisch onderzoek.) Het gemiddelde miltgewicht van een serie geinfecteerde embryonen kan dus als maatstaf gelden voor de activiteit en de uitgebreidheid van het tuberculeuze proces. Bij een gelijktijdige toediening van anti-tuberculeuze stoffen, kan men de werkzaamheid van de betrokken verbindingen bepalen door het gemiddelde miltgewicht van deze serie te vergelijken met het seriegemiddelde van onbehandelde tuberculeuze embryonen.

Langs experimentele weg werden de infectiedosis alsmede het tijdstip van de inoculatie bepaald, waarbij op de 20ste dag van de ontwikkelingsperiode – juist een dag voor het uitkomen van het ei – een zo hoog mogelijk gemiddeld miltgewicht werd bereikt bij een redelijk laag mortaliteitscijfer. Door op dit moment de proef te beëindigen, werd het infectie-gevaar voor de onderzoekers tot een minimum beperkt en het optreden van extra varianten vermeden.

Voor het routine-onderzoek werd een virulente humane stam van tuberkelbacteriën gekozen, de H37Rv, die door Dr W. H. Feldman van de Mayo Foundation, Rochester, Minnesota, ter beschikking was gesteld. Eerst nadat de verschillende variabelen van deze methode, zoals het tijdstip van de infectie, de duur van de broedperiode, de hoeveelheid in te spuiten tuberkelbacteriën, het aantal in te enten eieren e. d., zoveel mogelijk waren gestandaardiseerd, kon worden begonnen met het onderzoek naar de invloed van bekende chemotherapeutische verbindingen op het verloop van het proces.

Proefopstelling

Uiteraard werd van een vaste proefopstelling gebruik gemaakt,

waarbij voor het onderzoek van één dosis van een stof het aantal eieren in drie groepen: A, B en C, werd verdeeld. De eieren van de reeksen A en B werden op eenzelfde tijdstip intraveneus geinfecteerd met een bepaald aantal bacteriën. Vervolgens werden de eieren van de reeksen B en C behandeld met een dosis van de te onderzoeken verbinding, hetgeen geschiedde, door de oplossing op een vrij-geprepareerd deel van de chorio-allantoismembraan te druppelen. De eieren van groep C werden niet geinfecteerd. De groepen A en C zijn dus contrôle-groèpen; groep A is een contrôle op de kwaliteit van het inoculum, groep C is een contrôle op mogelijke specifieke reacties van het embryo op de te onderzoeken stof. Deze reeks dient tevens om ons een indruk te geven omtrent de toxiciteit van de stof bij de gebruikte dosis. Op de 20ste dag van de ontwikkelingsperiode werden alle miltjes van de in leven gebleven embryonen gewogen en het gemiddelde miltgewicht van de drie ei-reeksen met elkaar vergeleken. Ofschoon getracht werd van de intraveneuze inoculatie een zo groot mogelijke standaardisering te bereiken, is dit, zoals bij een biologisch experiment kan worden verwacht, niet volledig gelukt. Het is nu eenmaal een practische onmogelijkheid van elk inoculum naast het totale aantal, ook het aantal levende bacteriën te bepalen. Ook de virulentie, zelfs van de H37Rv stam, zou kunnen wisselen en invloed kunnen uitoefenen op de resultaten van de proefreeksen. Om deze reden werd in iedere proefopstelling een afzonderlijke serie opgenomen (groep A), teneinde een te grote afwijking van het standaard-gemiddelde van het miltgewicht te kunnen controleren. Indien het gemiddelde miltgewicht van deze serie te laag of de standaard-deviatie van dit gemiddelde te hoog was, kwam de gehele proef te vervallen. Het gemiddelde van groep A werd daartoe vergeleken met de gemiddelde uitkomsten van een zeer groot aantal waarnemingen verricht onder zoveel mogelijk dezelfde condities. Deze vormt dus de basis voor de verdere experimenten.

Wanneer nieuwe chemische verbindingen op hun tuberculostatische eigenschappen werden onderzocht, werden de resultaten van de groepen B van de betreffende preparaten vergeleken met de gemiddelden van de series van de overeenkomstige doseringen van een aantal bekende tuberculostatica. De resultaten van de groepen C werden direct vergeleken met de normale waarden, dat wil zeggen met het gemiddelde van de miltgewichten van een groot aantal normale embryonen.

Toen bleek, dat bekende tuberculostatische middelen het verwachte effect op de miltzwelling vertoonden (zie foto 9) en ook de histologische afwijkingen hiermede parallel liepen, leek het verantwoord om ook onbekende stoffen op deze wijze te onderzoeken en uit de resultaten van dit onderzoek conclusies te trekken over de werkzaamheid van deze stoffen in vivo.

Uitvoering van het experiment

Bereidingswijze van de bacterie-suspensie (zie foto 1)

Als cultuurmedium werd de voedingsbodem van Löwenstein gebruikt, een vast en eiwitrijk milieu, dat een constante groei waarborgt. Uitsluitend jonge cultures van circa 2 weken oud werden gebruikt, daar deze de beste resultaten gaven.

Het losmaken van cultures van de onderlaag werd vergemakkelijkt, door de glycerine uit de voedingsbodem weg te laten, hetgeen de groei van de bacteriën niet noemenswaardig beinvloedt.

De kolonies werden met een scherpe platte öse van de voedingsbodem losgemaakt, in een agaten mortier gebracht en fijn gewreven. Van de verkregen pasta werd een suspensie gemaakt, door er met een pipet-Pasteur druppelsgewijs 0,25 ml physiologische zoutoplossing, die 1% na-taurocholaat bevat, aan toe te voegen. Deze hoeveelheid werd, door het bijdruppelen van een physiologische zoutoplossing, onder voortdurend roeren, op 1 ml gebracht. Het maken van deze suspensie diende zeer zorgvuldig te geschieden, daar de fijnheid van de suspensie hiervan afhankelijk was. Na-taurocholaat bevordert door zijn oppervlaktespanningverlagende werking een homogenisering van de suspensie, waarin de bacteriën minder snel uitzakken. Door de bewerking met na-taurocholaat treedt, naar Drea mededeelt, bij deze concentratie geen groeiremming op van de tuberkelbacterie op een synthetische voedingsbodem.

Bepaling van het aantal bacteriën in de suspensie

De bepaling van het aantal tuberkelbacteriën per volume-eenheid van de suspensie is noodzakelijk. Men kan hierbij te werk gaan volgens verschillende methodes, het kan b.v. gravimetrisch geschieden of door middel van de optische dichtheidsbepaling van de suspensie.

De gravimetrische methode. Daar het bekend is, dat 1 mg bacteriemassa – niet ingedroogd gewogen – omstreeks 6 maal 10^7 tuberkelbacteriën bevat, kan, na voorafgaande weging van de oorspronkelijke bacteriemassa, door verdunning de gewenste bacterieconcentratie worden verkregen. Door middel van oriënterende experimenten kon worden vastgesteld, dat een dosis van 1/30 mg – dit is circa 2.000.000 bacteriën per ei – een maximale *miltzwelling* te weeg bracht bij redelijke mortaliteit (30-50%) van de behandelde eieren. Het bezwaar van deze methode is ongetwijfeld het optreden van variaties in het vochtgehalte van de oorspronkelijke bacteriemassa, waardoor het onmogelijk is een betrouwbare uitkomst te verkrijgen.

Optische dichtheidsbepaling. Wanneer men deze methode wil volgen, dan dient men vooraf een ijkingscurve te maken. Er moet hierbij voorop worden gesteld, dat voor elke gebruikte stam een afzonderlijke ijkingscurve moet worden gemaakt, daar de grootte der bacteriën – en daarmede de optische dichtheid – verschillend is. Ook zouden slijmvormende bacteriestammen, zoals de aviaire stammen, afwijkende bepalingen kunnen geven.

Bepaling van de ijkingscurve (Zie grafiek no. 1). Teneinde de verschillende punten van de curve te bepalen, werd gebruik gemaakt van de colorimeter van Kipp met groen lichtfilter. Met dit apparaat werd de lichtresorbtie van een aantal suspensies van bekende sterkte bepaald. De suspensies werden bereid op de bovenbeschreven wijze; voor elk te bepalen punt werd een afzonderlijke suspensie gemaakt. Om enigszins uit elkaar liggende waarden te verkrijgen, werden oriënterende wegingen van de tuberkelbacteriënmassa's verricht.

Van elke suspensie werd 0.05 ml verdund met physiologisch zout tot 5 ml, om de optische dichtheid van de suspensie te kunnen bepalen in de fotoelectrische colorimeter van Kipp. Van een nog resterend deel van de suspensie werd 0,05 ml vermengd met een gelijke hoeveelheid van een suspensie van gistcellen van een bekende concentratie, die meestal circa 1.000.000 cellen per mm^3 bevatte. Het aantal gistcellen per mm^3 is gemakkelijk te bepalen met behulp van een telkamer volgens Bürker. Alvorens uitstrijkpreparaten van dit mengsel te vervaardigen, werd nog een druppel Tween 80 toegevoegd, teneinde het samenklonteren van cellen en bacteriën tijdens het drogen te voorkomen. Deze mengsuspensies werden vervolgens op objectglazen uitgestreken en gedurende 24 uur gedroogd in de broedstoof bij 37^{o} C. Hierna werden de preparaten gekleurd volgens Hallberg, waarna de verhouding van de tuberkelbacteriën tot de gistcellen bij een duizendvoudige vergroting werd bepaald.

Hier en daar kwamen nog dicht opeengelegen groepjes bacteriën voor, waarvan het aantal werd geschat. Indien men op deze wijze eenmaal een dergelijke curve heeft bepaald, dan behoeft men van een vers bereide suspensie slechts de lichtresorbtie te bepalen om de bacteriënconcentratie onmiddellijk op de curve te kunnen aflezen.

Ten behoeve van de colorimetrische bepaling is het wenselijk uit te gaan van een voedingsbodem van een constante samenstelling.

De prophylaxe van secundaire infectie bij het kippenembryo. Het bleek, dat de embryonen zeer gevoelig zijn voor een secundaire infectie langs intraveneuze weg. Het is inderdaad niet te verwonderen, dat de reeds eerder genoemde bewerking van de tuberkelbacteriën tot suspensie, aanleiding kan geven tot secundaire infectie. Derhalve werden prophylactisch 25 E. penicilline per ml inoculum toegevoegd. Dit wordt dus $2\frac{1}{2}$ E. penicilline per ei.

Uit tabel no. 2 volgt, dat het penicilline, ook in hoge concentratie (zelfs tot 10.000 E. per inoculum) geen invloed uitoefent op de miltzwelling van het geinfecteerde embryo.

Reiniging van het glaswerk. Drea heeft er op gewezen, dat, bij het gebruik van zeer kleine inocula tuberkelbacteriën voor het enten van synthetische voedingsbodems, bijzondere eisen aan de voorbehandeling van het glaswerk dienen te worden gesteld, opdat geen groeiremming zal optreden. Hij heeft kunnen aantonen, dat in het bijzonder de sporen van onverzadigde vetzuren met lange ketens een belangrijke rol spelen. Ook in de kippenembryoproef werden soortgelijke ervaringen opgedaan. De toepassing van de

door Drea beschreven reinigingsmethode met het na-meta-silicaat bleek goed te voldoen.

De keuze van het ei-materiaal. De eieren van de in deze studie vermelde proefreeksen werden betrokken van een fokbedrijf [1], dat voor dit doel eieren van een raszuiver soort van witte leghorns reserveerde. De witte schaal bezit het voordeel, dat – reeds na een verblijf van één dag in de broedmachine – de bevruchting door middel van een kwiklamp kan worden gecontroleerd.

Ook het verloop van de bloedvaten van de chorio-allantois membraan kan bij een goede belichting zichtbaar worden gemaakt. Zodoende is het mogelijk op het tijdstip van de inoculatie de meest geschikte venen voor het inspuiten uit te zoeken en deze op de buitenzijde van de schaal aan te tekenen. Hierdoor kan men, wanneer men tot het inspuiten wenst over te gaan, volstaan met slechts een zeer kleine opening in de eischaal te maken, waardoor de functie van de luchtkamer grotendeels behouden blijft.

Broedperiode. De broedperiode valt in twee gedeelten uiteen [2], nl. in het gedeelte van 11 dagen voor de infectie en in dat van 9 dagen na de infectie. De totale ontwikkelingsperiode van embryo tot kuiken bedraagt 21 dagen.

Uit de literatuur is bekend, dat de intraveneuze injectie reeds op de 9e dag mogelijk is; de overleveringskansen zijn dan echter zeer gering. De 10e dag is reeds beter geschikt. Lee en Stavitsky prefereerden de 12e dag. Zij geven aan, dat de mortaliteit vergeleken met de 11e dag duidelijk kleiner is. Bij de hierbij beschreven proefnemingen werden op de 12e dag technische moeilijkheden ondervonden bij het vrij prepareren van de chorio-allantois membraan. Door de uiterst fijne verdeling van het vaatstelsel treden in dit stadium gemakkelijk kleine bloedingen op, die de injectie bemoeilijken. Ook de membraan wordt bij het vrij prepareren gemakkelijk beschadigd, waardoor het embryo afsterft. Derhalve werd de voorkeur gegeven aan de 11e dag.

Nadat de infectie had plaats gevonden, werden de in de eischaal gemaakte openingen afgesloten met één laag zgn. "Scotchtape" [3]. Dit is steriel cellophaan plakband, dat, vergeleken met andere handelsmerken, goed voldeed.

De eieren werden vervolgens in de tweede broedmachine geplaatst, voor de laatste broedperiode. Gedurende deze periode bleken de geopende eieren iets meer vocht te verliezen dan de ongeopende eieren. In tegenstelling tot de ervaringen van andere auteurs, zagen wij, dat een afsluiting met meerdere lagen Scotchtape geen verbetering bracht. De oorzaak zou hierin kunnen liggen, dat er slechts een klein gedeelte van de luchtkamer werd geopend.

Tijdens deze laatste broedphase werd de temperatuur in het broedvertrek door middel van een thermostaat constant gehouden. Dagelijks werden de gestorven exemplaren uit de broedmachine verwijderd. De grootste mortaliteit trad kort na de infectie op.

De aanwezigheid van secundaire (ent)infecties door sporenvor-

1) Pluimveefokbedrijf „Ter Hooghe", Leidschendam.
2) Hierbij werd gebruik gemaakt van afzonderlijke broedmachines (Merk: Econoom).
3) Scotch-cellophane Tape, gefabriceerd door Minnesota Mining and M.Fg. & Co.

mers verraadt zich vaak door een regelmatige vermindering van het aantal overlevende embryonen in deze periode.

Techniek van de intraveneuze injectie. Bevruchte eieren werden in de broedmachine geplaatst en na enkele dagen werd de bevruchting gecontroleerd met behulp van een kwiklamp. Na 11 dagen werden zij opnieuw uit de broedmachine genomen en op dezelfde wijze onderzocht (zie foto 2). Zowel de luchtkamer als de vaten van de chorio-allantois membraan tekenen zich hierbij duidelijk af. Deze membraan bekleedt mèt het witte schaalvlies de binnenzijde van de eischaal. De eischaal boven de luchtkamer wordt echter uitsluitend door het schaalvlies bekleed (zie figuur 1). Bij de grens van de luchtkamer buigt de membraan naar binnen en vormt, door het schaalvlies bedekt, de bodem van de luchtkamer. Zoals uit foto 2 blijkt, kunnen de bloedvaatjes, die in de membraan zijn gelegen, tot aan de rand van de luchtkamer worden gevolgd. Tijdens dit „schouwen" kan een keuze worden gemaakt uit het aantal zichtbare bloedvaatjes. Het vat, dat het meest geschikt was voor het inspuiten werd, door het aanbrengen van een teken op de buitenkant van de schaal, aangegeven en wel op de plaats, waar het naar binnen ombuigt; dit is op de rand van de luchtkamer. Het verloop van de luchtkamer werd op deze plaats door een horizontaal streepje op het ei aangeduid. Na joderen van de schaal werd hierin, met behulp van een randslijpende schijf, een kleine opening geboord (zie foto 3, 4 en 6). Deze opening werd nu met een pincet vergroot, zodat boven het gekozen vat voldoende ruimte ontstaat voor het afprepareren van het schaalvlies en het inbrengen van de injectienaald. Het afprepareren van het schaalvlies geschiedde, door de continuiteit van het vlies met een uiterst fijn naaldje te verbreken (zie foto 5). De punt van de naald werd naast het gekozen vat door het schaalvlies gestoken, zonder nochtans de onderliggende chorio-allantois membraan te perforeren. Door het naaldje daarna omhoog te bewegen werd een slipje van het schaalvlies opgelicht, waardoor dit naar boven omkrulde (zie figuur 2a). Het slipje kon nu tussen de punten van een fijne pincet worden gevat en een reepje van het vlies kon worden los geprepareerd (zie figuur 2b, c, d en e).

De vrij-geprepareerde vene werd vervolgens ingespoten met 0.05 ml van de geijkte suspensie van tuberkelbacteriën. Glazen tuberculine-spuitjes van 0,25 ml inhoud, voorzien van scherp geslepen naaldjes no. 27, leenden zich het beste voor dit doel. Men diende zo dicht mogelijk bij de rand van de schaal in te spuiten, daar de elastische membraan op deze plaats beter gefixeerd ligt (zie figuur 2f en foto 7). De punt van de naald werd eerst nagenoeg verticaal door de wand van het vat gestoken en vervolgens bijna evenwijdig aan de vaatwand naar binnen geschoven. Wanneer men de zuiger nu een weinig aandrukte, kon men, door de practisch kleurloze suspensie, het vat even zich oplichten. Dit gaf degene, die de handeling uitvoerde, een contrôle op het slagen van zijn verrichtingen. Men had echter nooit de volle zekerheid, dat men de tegenoverliggende wand niet eveneens geperforeerd had, waardoor een klein gedeelte van de suspensie naast

hoi vat zou zijn gespoten. In twijfelgevallen werd het ei niet in de reeks opgenomen.

Bij het terugtrekken van de naald ontstond een kleine bloeding. De omvang van de bloeding was afhankelijk van de diameter van het gekozen vat en bepaalde mede de mortaliteit van het ei. Beschikte men over de nodige ervaring, dan koos men bij voorkeur de kleinere venen om in te spuiten.

In sommige gevallen had men geen keuze uit de kleinere vaten en was men genoodzaakt een groter vat te nemen. In dat geval kon men de bloeding stelpen door middel van een zgn. gelfoam, gedoopt in thrombine, zoals Lee en Stavitsky hebben aangegeven.

De toediening van de te onderzoeken stoffen

De stoffen werden in het algemeen in opgeloste toestand op het vrij-geprepareerde deel van de chorio-allantois membraan gedruppeld met behulp van een tuberculine-spuit. Slechts indien de stof niet in de vereiste hoeveelheid vloeistof oplosbaar was, werd gebruik gemaakt van de suspensievorm. De stoffen werden opgelost in physiologisch zout. Slecht oplosbare zuren werden vooraf geneutraliseerd tot natrium zouten. De doseringen werden uitgedrukt in de vrije zuurwaarden. Het totale volume per ei bedroeg 0.05 ml. De steriliteit van de chemische verbindingen werd gewaarborgd doordat er gebruik werd gemaakt van steriel glaswerk tijdens de laatste bewerkingen, die de stoffen bij de bereiding moesten ondergaan.

Het toedienen van de stoffen geschiedde onmiddellijk na de intraveneuze injectie van de bacterie-suspensie. De eieren van de groepen C ondergingen dezelfde behandeling met uitzondering van de intraveneuze infectie.

Sectie van de embryonen

Op de 20ste dag van de broedperiode werden de overlevende embryonen door middel van chloroformdamp gedood. Vervolgens werden zij uit de eischalen genomen, overgoten met alcohol (70%) en geseceerd. Bij deze bewerking werd allereerst een gedeelte van lever en long voor kweekproeven gereserveerd. Een ander deel van deze organen vergezeld van een stukje nierweefsel werd in alcohol (70%) of formoloplossing (3%) opgevangen voor histologisch onderzoek. De milten werden in hun geheel vrijgeprepareerd en in een vochtige Petrischaal tegen uitdroging behoed (zie foto 8), tot zij werden gewogen. Van iedere groep werd een deel van de eieren op deze wijze behandeld. Van de overgebleven embryonen werden slechts de milten gewogen. Na het wegen werden de milten, die bij de reeds geconserveerde organen behoorden, eveneens voor histologisch onderzoek bewaard.

Om de kippenembryomethode op zijn waarde te kunnen toetsen, werd een aantal van de meest bekende tuberculostatica volgens de bovenbeschreven methode uitvoerig onderzocht.

RESULTATEN

A. Het onderzoek van clinisch toegepaste tuberculostatica.

De macroscopisch waarneembare veranderingen kunnen op een zeer eenvoudige wijze in het miltgewicht tot uitdrukking worden gebracht, aangezien de milt als gevolg van de tuberculeuze infectie, sterk toeneemt in grootte.

Uit de eerder besproken proefopstelling resulteren dus 3 kolommen van miltgewichten, te weten:
Groep A (alleen t.b.c.), Groep B (t.b.c. en anti-tuberculeuze stof), Groep C (alleen anti-tuberculeuze stof). Van iedere groep werd het gemiddelde miltgewicht bepaald en tevens de standaard deviatie van dit gemiddelde volgens de formule:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{(\chi 1 - \bar{x})^2 + (\chi 2 - \bar{x})^2 + \ldots\ldots (\chi n - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$\chi_1, \chi_2, \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \chi_n$ = miltgewichten in mg.
n = aantal waarnemingen per groep.
$S_{\bar{x}}$ = standaard deviatie voor $\bar{x}$.

Bij een krachtig werkzame dosis kan men verwachten, dat de miltgewichten van de groepen B en C op hetzelfde niveau komen te liggen, bij een onwerkzame dosis is dit het geval met de miltgewichten van de groepen A en B.

Wij hebben getracht van de bekende tuberculostatica in de eerste plaats de zgn. maximaal werkzame dosis te vinden, door uit te gaan van de hoogste dosis, die het embryo kan verdragen en vervolgens de dosis trapsgewijze te verminderen totdat de miltgewichten van de groepen B, waarvan de miltzwelling door het tuberculostaticum tot dan toe volledig onderdrukt werd, beginnen te stijgen. De dosis, waarbij de gemiddelde miltgewichten van de groepen B en C nog juist gelijk zijn, wordt de maximaal werkzame dosis genoemd. Vervolgens werd de dosis nog verder verminderd tot de hoogte bereikt werd, waarbij de gemiddelde miltgewichten van de groepen B en A niet meer significant verschillen en de stof zijn therapeutische werking verliest. De dosis, waarbij het verschil nog juist significant is, wordt de „nog juist werkzame" dosis genoemd. Hierbij zij reeds opgemerkt, dat later over de „minimaal werkzame dosis" gesproken zal worden, hetgeen een ander begrip vertegenwoordigt en op pag. 20 wordt gedefinieerd.

De significantieberekening geschiedde als volgt:
Als $\bar{x}$ en $\bar{y}$ de gemiddelden zijn van de groepen A en B, met standaard deviaties $S_{\bar{x}}$ en $S_{\bar{y}}$, dan vindt men de standaard deviatie van het verschil $d = \bar{x} - \bar{y}$ volgens de formule:

$$Sd = \sqrt{S_{\bar{x}}^2 + S_{\bar{y}}^2}.$$

Het quotiënt $t = d : S_d$ is bij benadering normaal verdeeld. Als t afgezien van het teken groter is dan 2, is de overschrijdingskans of onbetrouwbaarheidsdrempel kleiner dan 5% en wordt het verschil tussen de groepen A en B als significant beschouwd. Een overschrijdingskans of onbetrouwbaarheidsdrempel van 5% of minder wil zeggen, dat de kans, dat het gevonden verschil op toeval zou berusten, gelijk of kleiner zou zijn dan 5% (zie als voorbeeld tabel no 3 en 4).

Deze betrekkelijk eenvoudige bewerking van de verkregen gegevens, geeft reeds dadelijk een inzicht in de werkzaamheid van de onderzochte tuberculostatica. De op bovenstaande wijze bewerkte resultaten zijn samengevat in de overzichtstabellen no 5 t/m 9. In tabel no 5 t/m 9 vindt men de gemiddelde miltgewichten met hun standaard deviaties van de groepen A, B en C, alsmede de overschrijdingskans of onbetrouwbaarheidsdrempel van de verschillen tussen de groepen A en B.

Werkzaamheid der beproefde tuberculostatica

Streptomycine. Tabel no. 5.

Conclusie: Het streptomycine blijkt bij een concentratie van 250 γ bijna maximaal werkzaam te zijn, terwijl de „nog juist werkzame" dosis ongeveer bij 100 γ ligt.

P.A.S. Tabel no. 6.

Conclusie: De dosis van 250 γ is hier nog maximaal werkzaam. Bij 50 γ kan nog juist een significant verschil tussen beide groepen A en B worden aangetoond. Het is ons gebleken, dat het P.A.S. een zeer ruime werkingsbreedte bezit, daar een dosis van 10 mg – dus 40 maal de maximaal werkzame dosis – nog redelijk goed verdragen wordt.

Benzoyl-P.A.S. Tabel no. 7.

Conclusie: Daar dit P.A.S.-derivaat onderzocht werd in het kader van een grotere reeks van P.A.S.-derivaten, was het onderzoek minder uitvoerig. Zelfs met de 20 γ dosis werden nog significante verschillen tussen de beide groepen A en B gevonden. Het benzoyl-P.A.S. doet in deze proef dus zeker niet onder voor het P.A.S. Mogelijk werkt het zelfs beter. Uitbreiding van het onderzoek is hier zeker gewenst.

4-Acetyl-amino-benzaldehyd thiosemicarbazon. Tabel no. 8.

Conclusie: Bij deze verbinding treedt de toxiciteit in hoge mate op de voorgrond. Met een dosis van 50 γ gingen practisch alle eieren dood. Waarschijnlijk ligt de „nog juist werkzame" dosis bij 30 γ. Om dit te bewijzen zou men echter een groot aantal eieren moeten opofferen. Deze verbinding is dus voor ons proefobject te toxisch.

I.N.H. (iso-nicotinyl-hydrazide). Tabel no. 9.

Conclusie: De maximaal werkzame dosis bedraagt 500 γ. De dosis van 250 γ geeft een directe stijging te zien tot 37.4 mg; men dient er echter rekening mede te houden, dat het gemiddelde van de contrôlegroep A zeer hoog ligt, nl. bij 93.8 mg. De „nog juist werkzame" dosis bedraagt ongeveer 145 γ. De toxiciteit bij een dosis van 500 γ was niet merkbaar. Toxiciteits-onderzoek van hogere concentraties werd niet verricht.

B. Het onderzoek van nieuwe of weinig bekende tuberculostatica

Het onderzoek van de bekende tuberculostatica heeft de bruikbaarheid van de methode bewezen voor het analyseren van de tuberculostatische eigenschappen van chemische verbindingen in vivo. Op grond van de opgedane ervaringen werden nieuwe verbindingen onderzocht volgens dezelfde gestandaardiseerde techniek.

In de eerste plaats is het van belang na te gaan of de gekozen verbinding in de eiproef een tuberculostatische werkzaamheid bezit. Alle nieuw te onderzoeken verbindingen werden daartoe bij een bepaalde dosis onderzocht. Het is gewenst, dat de proefdosis niet te laag ligt. Ook is het van betekenis, dat zij zo mogelijk niet uitkomt boven de maximaal werkzame dosis. Bij de keuze van een geschikte proefdosis hebben wij ons laten leiden door de uitkomsten, verkregen met P.A.S., streptomycine en I.N.H. Een dosis van 250 γ per ei bleek bij deze drie verbindingen de tuberculeuze miltzwelling practisch te onderdrukken, zonder dat de maximaal werkzame dosis hierbij werd overschreden. Er werd besloten deze dosis te kiezen als proefdosis voor de nieuwe verbindingen. Een negatief resultaat, d.w.z. een afwezigheid van statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden van de A- en de B-groep, werd opgevat als een teken, dat de tuberculostatische werkzaamheid van deze verbinding zo gering was, dat verdere onderzoekingen niet meer de moeite waard waren. Bij een positief resultaat werden ook de lagere doseringen onderzocht om de „nog juist werkzame" dosis op te sporen. Tevens werd men op deze wijze enigszins georiënteerd omtrent de toxiciteit van de stof. Indien alle embryonen sterven, dan is de getoetste verbinding belangrijk toxischer dan eerstgenoemde drie.

Van de ± 400 gesynthetiseerde verbindingen [1]) werden er 19 gekozen voor de eiproef op grond van hun werkzaamheid in vitro. Onder leiding van Dr A.J. Zwart Voorspuij, Conservator van het klinisch laboratorium van de Interne Afdeling van het Academisch Ziekenhuis te Leiden, werden de bepalingen in vitro verricht met gebruikmaking van het synthetische vloeibare milieu volgens Youmans en de vaste eiwithoudende voedingsbodem volgens Beew-

*) De synthese heeft plaats gevonden in de Researchafdeling van N.V Koninklijke Pharmaceutische Fabrieken v/h Brocades-Stheeman & Pharmacie te Amsterdam (Hoofd Prof.Dr. W. Th. Nauta met medewerking van Dr C.v.d. Stelt).

kes (dit is een gemodificeerde Löwenstein-voedingsbodem). Nadere bijzonderheden werden elders door Dr Zwart Voorspuij gepubliceerd. De in vitro-bepalingen werden verricht met gebruikmaking van de H37Rv stam en voor de duplo-bepaling werd een patiëntenstam of de Ravenelstam aangewend.

De stoffen werden beoordeeld naar hun groeiremmend vermogen gedurende drie weken bij een concentratie van maximaal 8 γ per ml. De stoffen, die beneden een concentratie van 8 γ per ml een volledige groeiremming te zien gaven, werden voorbestemd voor de eiproef. Het is echter zeer goed mogelijk, dat men, indien men volgens dit schema te werk gaat, een aantal stoffen van het in vivo-onderzoek uitsluit, die wel degelijk in het dierexperiment werkzaam zijn. Bij het vooronderzoek werd reeds met een dergelijke stof gewerkt, nl. het benzoyl-P.A.S. Uit economisch oogpunt was het echter niet goed mogelijk om alle gesynthetiseerde verbindingen aan de in vivoproef te onderwerpen. In bijzondere gevallen werd er ook van deze regel afgeweken.

De gegevens omtrent de bepalingen in vitro, zomede het resultaat van de eerste proefdosis, zijn samengevat in tabel no. 10. Het resultaat van de proefdosis staat vermeld in de overschrijdingskans, d.w.z. er wordt aangenomen, dat een stof in de eiproef tuberculostatisch werkzaam is, indien het gevonden verschil tussen het gemiddelde miltgewicht van de behandelde embryonen vergeleken met het gemiddelde miltgewicht van de niet-behandelde embryonen statistisch significant is. Was de uitslag positief, dan werden ook lagere doseringen onderzocht. De resultaten zijn weergegeven in de tabellen no 15 t/m 23.

Van de onderzochte verbindingen bleken in de kippenembryoproef slechts de P.A.S.-derivaten werkzaam te zijn.

C. Bespreking van de resultaten

Bij de kippenembryoproef blijkt de werkzaamheid van P.A.S., I.N.H. en streptomycine ongeveer van dezelfde grootte te zijn. Een essentieel verschil met andere dierproeven is gelegen in het feit, dat het kippenembryo niet in staat is de toegediende stoffen door een snelle excretie te elimineren. De geheel andere physiologie van het kippenembryo bemoeilijkt dus de vergelijking van een kippenembryo-proef met dierexperimenten, maar men krijgt door deze proef een beter beeld van het potentieel vermogen van een verbinding. Een andere factor, die van belang is bij de beoordeling van het resultaat van een proef, is, in hoeverre de gebruikte stam homogeen gevoelig is voor de toegepaste verbinding. Uit het in vitro onderzoek is ons gebleken, dat de H37Rv stam niet geheel homogeen gevoelig is voor I.N.H. Caviaproeven hebben aangetoond, dat slechts 1 procent van de H37Rv stam streptomycineresistent behoeft te zijn om het effect van de streptomycine-therapie grotendeels teniet te doen (Steenken en Wolinsky 1948). Ook wij deden soortgelijke ervaringen op met de Ravenel-stam ten aanzien van het I.N.H. Deze stam bevatte naar schatting 1-5% primair ongevoelige bacteriën in vitro. Onder overeenkomstige

standaardcondities met de Ravenel-stam als inoculum bleek 500 γ I.N.H. per ei niet in staat te zijn het gemiddelde miltgewicht van de tuberculeuze embryonen te beinvloeden (tabel no. 11).

Zoals te verwachten was, hadden P.A.S. en streptomycine in deze proef geen merkbare invloed op de H37Rv stammen, die resistent waren tegen deze middelen (tabel no. 12). Een zgn. kruisresistentie kon niet worden aangetoond, evenmin een virulentieverlies van de resistente stammen, zoals wel voor het streptomycine wordt aangegeven (Feldman 1948) (tabellen no. 13 en 14).

Opmerkelijk is de werkzaamheid van het benzoyl - P.A.S. (tabel no. 7). Hoewel het in vitro slechts in beperkte mate bacteriostatisch werkt, is het bij de kippenembryoproef minstens even werkzaam als het P.A.S. Volgens Hunri (1951) en Debray (1950) zou het benzoyl-P.A.S. zelfs beter werkzaam zijn. Ook enkele andere P.A.S. derivaten zoals het broom-butycyl-P.A.S. en het acetyl-P.A.S. (tabel no.18 en 19) waren in de kippenembryoproef practisch even werkzaam als het P.A.S. Indien de werkzaamheid van de derivaten uitsluitend zou berusten op vrijkomend P.A.S., dan zou men mogen verwachten, dat de benodigde gewichtshoeveelheden bepaald worden door het P.A.S.-aequivalent van het derivaat. De verkregen gegevens zijn echter in strijd met deze opvatting. Men kan hier tevens uit afleiden, dat het P.A.S. niet door acetylering onwerkzaam wordt gemaakt (tabel no.18). De onderzochte P.A.S.-derivaten zijn op twee na toxischer dan P.A.S. Daar zij evenmin werkzaam zijn tegen de P.A.S.-resistente stammen, hebben wij afgezien van verder onderzoek (tabel no. 25). Een uitzondering vormt het acetyl-P.A.S. en het benzoyl-P.A.S. Laatstgenoemde stof heeft zijn plaats in de kliniek al veroverd. Het acetyl-P.A.S. zal nog verder onderzocht dienen te worden. Volgens de proeven van Koelzer (1951) is de toxiciteit voor de muis een vierde deel van die van het P.A.S.

Uit deze uitkomsten, die wij verkregen met de kippenembryoproef, is komen vast te staan, dat er niet altijd een parallelliteit bestaat tussen de uitkomsten van het onderzoek in vitro en de uitkomsten van de kippenembryoproef. Stoffen, die in vitro weinig of niet werkzaam waren, gaven goede resultaten bij de eiproef. Ook het omgekeerde kwam voor, zoals de proeven met het chlooramphenicol en het oxytetracycline uitwezen (tabel no. 24) (zie ook Youmans en medewerkers 1948 en 1950).

Gedurende het onderzoek hebben wij ons afgevraagd of het mogelijk zou zijn de werkzaamheid van een chemische verbinding uit te drukken in een zgn. dosiswerkingscurve. De curve zou enerzijds begrensd worden door het niveau van de controle-groep C, hetgeen overeenkomt met de maximaal werkzame dosis, anderzijds door het niveau van de tweede contrôlegroep A, overeenkomende met het niveau van de minimaal werkzame dosis.

Het bepalen van de punten, die bij de einden van de dosiswerkingscurve gelegen waren, vormde onze grootste moeilijkheid. Kent men de vorm van de curve, dan kan men de moeilijkheden omzeilen door een dosis te kiezen, die niet te dicht bij de grenswaarden van de curve ligt.

Wanneer blijkt, dat de dosiswerkingscurven van de onder-

zochte verbindingen een evenwijdig verloop hebben, dan kan men, volgens de ervaringen in de biologie opgedaan, verwachten, dat curves van andere werkzame verbindingen zich evenzo zullen gedragen. Een voorbehoud moet worden gemaakt voor stoffen, die zeer bijzondere bijv. extreem toxische eigenschappen bezitten.

De Heer C.A.G. Nass – Hoofd van de Statistische Afdeling van het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden – was zo vriendelijk de verkregen resultaten statistisch te bewerken en te trachten een dosiswerkingscurve van de onderzochte verbindingen te bepalen. De Heer Nass is er in geslaagd een dosiswerkingscurve te vinden voor die verbindingen, waarvan een voldoend aantal werkzame doseringen bekend was. Voor een beschrijving van de gevolgde werkwijze en de resultaten van zijn berekeningen verwijzen wij naar pagina 30. De resultaten van zijn statistisch onderzoek laten zich als volgt samenvatten.

1) De dosiswerkingscurve, waarmee de verkregen resultaten in overeenstemming waren te brengen, had een sigmoide gedaante.
2) De vorm en het niveau van de x-waarden van de verschillende dosiswerkingscurven bleken onderling niet significant te verschillen, m.a.w. de werkzaamheid van streptomycine, I.N.H., P.A.S. en de P.A.S.-derivaten bleken statistisch niet significant te verschillen. De werkzaamheid van deze verbindingen kon in één getal worden uitgedrukt, waarvoor de „halfwerkzame" dosis werd gekozen. Deze kwam overeen met een dosis van 108γ per ei.
3) Van een nieuw te onderzoeken verbinding behoeft men maar één punt, gelegen binnen het niveau van de dosiswerkingscurve, nauwkeurig te bepalen om de „halfwerkzame" dosis met een zeer grote waarschijnlijkheid te kunnen berekenen. Deze conclusie vereenvoudigt de proefopstelling.

D. Het verband tussen het miltgewicht en de microscopisch waarneembare tuberculeuze afwijkingen

Van iedere proefserie werden van de 3 groepen A, B en C van een bepaald aantal kippenembryonen de volgende organen bewaard voor microscopisch onderzoek, nl. lever, long, milt en nier.

Techniek. De organen, bestemd voor het microscopisch onderzoek, werden gefixeerd in een 3% formol-oplossing of in 70% aethyl-alcohol. Voor het routine-onderzoek werden 20 seriecoupes vervaardigd. De ene helft werd gekleurd met haematoxyline-eosine, de andere helft met Nachtblauw volgens Hallberg (bacterie-kleuring).

Beoordeling van de preparaten. Wanneer er uitgebreide tuberculeuze weefselveranderingen in een orgaan te zien waren, werd het percentage van het zieke weefsel per gezichtsveld bepaald met behulp van een oculairmicrometer. Door ± 10 gezichtsvelden in serie te vervolgen en het gemiddelde percentage te bepalen van het tuberculeuze weefsel, werd een maatstaf verkregen om de uitgebreidheid van het proces in het onderzochte brokje weefsel te kunnen uitdrukken. Vervolgens werd genoteerd hoeveel granulomen

er voorkomen per oppervlakte-eenheid. De waargenomen granulomen werden ingedeeld volgens grootte in 4 verschillende types, zoals van Beek en Haex het hebben aangegeven voor de beoordeling van tuberkels in een aspiratieleverbiopsie. Verder werd gelet op necrose-vorming en de ligging van de tuberkelstructuren in het weefsel. De bacterierijkdom van de preparaten werd beoordeeld met behulp van de Nachtblauw kleuring volgens Hallberg.

Wij hebben ons in de eerste plaats afgevraagd, hoe de uitbreiding zou zijn van het tuberculeuze proces in lever, long, milt en nier van kippenembryonen van de A-groep, d.w.z. van de tuberculeuze embryonen, die niet met chemotherapeutica zijn behandeld.

Voor dit doel werden de vier bovengenoemde organen van 6 kippenembryonen in serie volgens de bovenbeschreven methode onderzocht. De miltgewichten van de betrokken embryonen kwamen overeen met het gemiddelde van een groot aantal waarnemingen, nl. ± 40 mg.

Resultaten

Lever

Uit de beschrijving van de preparaten van de zes embryonenlevers kan samenvattend het volgende worden gezegd. De tuberculeuze laesies hebben een overwegend proliferatief karakter. In practisch ieder gezichtsveld treft men perivasculaire celinfiltraten aan, bestaande uit mononucleaire cellen met een wat hoekige kern en donker gekleurd protoplasma. Hiertussen liggen enkele leucocyten, voornamelijk eosinophiele. Men vindt de celinfiltraten hoofdzakelijk rond de venae centrales. Op vele plaatsen hebben zich in deze zgn. rondcelinfiltraten granulomen gedifferentieerd. In sommige gevallen zijn de granulomen scherp afgegrensd. Meestal echter zijn zij omgeven door een randzône van de mononucleaire cellen. Ook de granulomen zijn merendeels pericentraal gelegen. Zij behoren voor het grootste deel tot het type III. Binnen de donkergekleurde mononucleaire cellen, dus meer naar het centrum, worden de cellen lichter van kleur en vervagen de celgrenzen. Schrijdt dit proces nog verder voort, dan treedt necrosevorming in het centrum van het granuloompje op. Deze geringe necrose werd vaak waargenomen. Reuscellen kwamen in de lever slechts bij hoge uitzondering voor. De grotere granulomen zijn meestal in het periportale bindweefsel gelegen. Type II treft men nog wel eens aan, het type I is vrij zeldzaam. Evenals bij de mens bestaan de grotere types uit conglomeraattuberkels. De Hallberg-kleuring toonde aan, dat men hier inderdaad met tuberculeus weefsel te maken heeft (ondanks het feit, dat de granulomen een enigszins andere structuur hebben dan bij zoogdieren). In deze tuberkelstructuren vindt men zonder moeite grote aantallen zuurvaste staafjes. Ent men wat leverweefsel op de Löwenstein-voedingsbodem, dan slaan de cultures binnen enkele weken aan. In het normale leverparenchym komt men slechts

zo nu en dan een groepje tuberkelbacteriën tegen. De gedisseminneerde tuberculeuze haarden zijn gemakkelijk van het leverparenchym te onderscheiden. Samenvattend kan men zeggen, dat de tuberculeuze veranderingen in de lever bestaan uit haematogeen ontstane granulomen en talrijke perivasculaire zgn. rondcelinfiltraten, waarin de tuberkelbacteriën gemakkelijk aantoonbaar zijn.

Milt

In de milt zijn de weefselveranderingen van een veel grotere omvang. Zij zijn echter minder goed van het normale miltreticulum te onderscheiden en de overgang naar het normale miltweefsel vindt geleidelijk plaats. In het algemeen kan men zeggen, dat de tuberculeuze weefselveranderingen bestaan uit sterke reticulumproliferaties met een geringe centrale necrose. In vele gevallen bestaan uitgebreide haemorrhagieën. In de centra hiervan ziet men dan nog de overblijfselen van de oorspronkelijke vaatwand. De haardvormige reticulumproliferaties vertonen centraal een grote massa uiteengevallen erythrocyten met enkele leucocyten, omzoomd door resten van de vaatwand. Hier liggen zo nu en dan ook enkele reuscellen van het vreemd-lichaam type met talrijke kleine donkere kernen. Soms bestaat een centrum uit een celarm gebied met langgerekte reticulumcellen met lange uitlopers, waartussen zich een eosinophiele substantie bevindt, waarschijnlijk afkomstig van afgebroken erythrocyten en andere celelementen. Hierop volgt een zône van losmazig reticulumweefsel, waarin zich vele gedestrueerde bloedcellen bevinden. Meer naar de periferie wordt het weefsel steeds celrijker, en ook komen er dan talrijke kleine bloedvaatjes in voor. Er is een geleidelijke overgang naar het normale parenchym. Op de grootste doorsnede van het preparaat treft men ongeveer 3 tot 8 van dergelijke haardvormige structuren aan. In het gebied onder de miltkapsel bevinden zich nog de grootste gebieden met een normale weefselstructuur.

Wanneer de Hallbergkleuring toegepast wordt, ziet men in de genoemde haarden verspreid liggende groepjes van tuberkalbacteriën. Zij komen nergens in zo grote getale voor als bij de levergranulomen.

In de milt bevinden zich dus uitgebreide haardvormige reticulumproliferaties met een lichte centrale necrosevorming en vaak uitgebreide multipele haemorrhagieën. Zij hebben geen typisch tuberculeus karakter en er is een geleidelijke overgang naar normaal weefsel. De bacterierijkdom is in vergelijking met de lever veel geringer.

Longen

In de longen worden sporadisch voorkomende granuloompjes waargenomen van eenzelfde structuur als in de lever. Hierin kan men meestal gemakkelijk de zuurvaste staafjes aantonen. Ook in het normaal uitziende longparenchym ziet men een enkele maal tuberkelbacteriën.

Nieren

Nog zeldzamer zijn de granuloomstructuren in de nieren. Wel ziet men zo nu en dan in de wand van een glomerulusvaatje of in de tubuluswand enkele bacteriën.

Samenvatting: In de milt worden de grootste weefselveranderingen waargenomen. Door de reticulaire structuur van de milt zijn zij echter niet zo gemakkelijk af te grenzen.

In de lever komen talrijke verspreide tuberculeuze haarden voor, bestaande uit goed gedifferentieerde granulomen en zgn. rondcelinfiltraten. Zij zijn gemakkelijk waar te nemen en goed te onderscheiden van het leverparenchym. In de longen en de nieren treft men slechts sporadisch afwijkingen aan. Voor het routine-onderzoek verdient de lever de voorkeur.

Eveneens hebben wij een onderzoek ingesteld naar de uitgebreidheid van de tuberculeuze afwijkingen in de lever en de milt van embryonen van de A-groep met een exceptioneel hoog miltgewicht. Bij 4 embryonen, waarvan het miltgewicht varieerde van 130 tot 340 mg, werden serie-coupes vervaardigd van lever en milt, die op de gebruikelijke wijze werden onderzocht. Inderdaad bleken de tuberculeuze afwijkingen veel uitgebreider in vergelijking met die van de vorige groep. Er was meer necrosevorming, waarbij de tuberculeuze haarden in de lever belangrijk meer tuberkelbacteriën bevatten. In de milten werd een zeer sterke reticulumprikkeling waargenomen. Ook kwamen in de meeste miltcoupes uitgebreide haemorrhagische gebieden voor.

Wij kunnen hier dus de conclusie uit trekken, dat er een correlatie bestaat tussen het miltgewicht en de microscopisch waarneembare afwijkingen.

Vervolgens werd nagegaan of deze stelling ook opgaat voor de embryonen van de B-groep. We hebben daartoe de histologische bevindingen van embryonen van de A-groep vergeleken met die van de B-groep. Voor de B-groep werden embryonen gekozen, die behandeld waren met P.A.S., streptomycine en I.N.H. bij drie verschillende doseringen: de maximaal werkzame dosis, de zgn. „halfwerkzame" dosis en de minimaal werkzame dosis. Het microscopisch onderzoek werd zo veel mogelijk verricht bij die embryonen, waarvan het miltgewicht overeen kwam met het gemiddelde van de serie. Het resultaat van dit onderzoek is uit tabel no. 26 af te lezen. Een kleine dosis heeft dus een nauwelijks merkbare invloed op de tuberculeuze veranderingen. Een hoge dosis onderdrukt de ontwikkeling van het tuberculeuze proces in de lever practisch volledig.

Om de verkregen resultaten met de gekozen proefdosis van 250 γ ook in histologisch opzicht te verifiëren, werd, op een overeenkomstige wijze, met elkaar vergeleken de 250 γ dosis van P.A.S. en I.N.H. met de 250 γ dosis van 4 werkzaam bevonden P.A.S.-derivaten, nl. het mono-, het di- en het trichloor-acetyl-P.A.S. en het acetyl-P.A.S. Zie tabel no. 27. De gekozen proef-dosis is dus bij deze verbindingen in staat het proces practisch volledig in zijn ontwikkeling te remmen.

Ook werd een microscopisch onderzoek ingesteld naar de afwijkingen in de levercoupes van embryonen, behandeld met verbindingen, die *niet* in staat waren de tuberculeuze miltzwelling te onderdrukken, zoals het chlooramphenicol en het oxytetracycline. Tabel no. 27.

Tenslotte werd een onderzoek ingesteld naar de uitbijters van de C-groep. Op de 1400 miltgewichten van de C-groep kwamen er 5 voor met een miltgewicht boven de 20 mg (20-48 mg). In 4 van de 5 gevallen werden acute stuwingsverschijnselen gezien, in het vijfde geval moet de oorzaak waarschijnlijk gezocht worden in een laboratorium fout, daar er in de milt tuberculeuze afwijkingen werden aangetroffen, terwijl er in de lever geen enkel teken van tuberculose te zien was.

Conclusie. Er is een duidelijke correlatie tussen het miltgewicht en de microscopisch waarneembare tuberculeuze afwijkingen.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

De kippenembryoproef van Lee en Stavitsky hebben wij als routine-methodiek ontwikkeld om ons in staat te stellen in betrekkelijk korte tijd en met relatief lage kosten een indruk te krijgen van de anti-tuberculeuze eigenschappen van een chemische verbinding. Door deze proef te laten voorafgaan aan de cavia- of muisproef, is het mogelijk één dezer laatstgenoemde kostbare en tijdrovende proeven alleen voor die stoffen te gebruiken, die met de kippenembryoproef reeds min of meer gunstige resultaten hebben opgeleverd en waaromtrent men dus verwachtingen mag koesteren.

De principes van de kippenembryoproef zijn:

a. dat de stijging van het miltgewicht van het kippenembryo tot een zekere grens parallel loopt met de ernst van de tuberculeuze infectie.
b. dat de anti-tuberculeuze eigenschappen van een stof zijn af te lezen uit het vermogen van die stof om de onder a genoemde stijging van het miltgewicht te onderdrukken.

De werkzaamheid van tuberculostatica op het tuberculeuze proces in het kippenembryo werd histologisch onderzocht. De uitgebreidheid van de histologische afwijkingen blijkt in overeenstemming te zijn met de stijging van het miltgewicht

Een aantal stoffen – waaronder P.A.S.-derivaten –, waarvan de antituberculeuze eigenschappen niet of niet volledig onderzocht waren, werden met de kippenembryoproef onderzocht. De dosiswerkingscurven van streptomycine, I.N.H., P.A.S. en een aantal P.A.S.-derivaten bleken onderling niet significant te verschillen. De werkzaamheid van deze verbindingen kon dus in één getal worden uitgedrukt, waarvoor de halfwerkzame dosis (the medium effective dose) werd gekozen.

Voor de berekening van de half werkzame dosis van een nieuwe verbinding, kan men volstaan met de bepaling van een willekeurig punt van de dosiswerkingscurve.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

We have developed the chick embryo test of Lee and Stavitsky into a routine method for obtaining, in a comparatively short time and at a relatively low cost, an impression of the anti-tuberculous properties of a chemical compound. This method enables us to reserve the expensive and time-consuming tests on guinea pigs or mice for those substances which have shown promising results in the chick embryo test.

The principles of the chick embryo test are:

a. that the increase in weight of the chick embryo spleen runs, up to a certain point, parallel with the seriousness of the tuberculous infection.

b. that the anti-tuberculous properties of a chemical substance can be determined by its suppressing influence on the increase of the spleen's weight.

The effect of tuberculostatics on the tuberculous process in the chick embryo tissues has been examined. The extent of the pathological changes is proportional to the increase in weight of the spleen.

A number of compounds, including P.A.S.-derivatives, of which the anti-tuberculous properties were not or not sufficiently known, were tested by the chick embryo method. The dosage-response curves of streptomycine, I.N.H., and a number of P.A.S.-derivatives proved to be identical. The activity of these compounds can, therefore, be expressed by the same quantity for which the medium effective dose has been chosen.

In order to calculate the medium effective dose of a new compound it is sufficient to take an arbitrary point on the dosage-response curve.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons développé l'expérience de Lee et Stavitsky sur l'embryon de poule comme routine méthodique, afin de nous permettre d'obtenir, en un temps relativement bref et à peu de frais, une impression sur les propriétés anti-tuberculeuses d'une combinaison chimique: Le fait de faire précéder cette expérience à celle sur le cobaye ou la souris, nous donne la possibilité de n'employer qu'une seule des dernières expériences nommées, coûteuses en temps et argent, que pour ces matières donnant des résultats plus ou moins favorables suite à l'expérience sur l'embryon de poule et dont on peut donc supposer des résultats positifs.

Le principe de l'expérience sur l'embryon de poule est le suivant:

a. que l'augmentation en poids de la rate de l'embryon de poule est jusqu'à un certain point parallèle à la gravité de l'infection tuberculeuse.

b. que les propriétés anti-tuberculeuses d'une matière dosée peuvent être déduites de son pouvoir de répression sur l'accroissement en poids de la rate mentionnée sous a.

L'efficacité des tuberculostatiques sur le procès tuberculeux dans l'embryon de poule fut etudiée histologiquement. L'étendue des changements histologiques parait être conforme à l'accroissement en poids de la rate.

Un certain nombre de matières — sous lequel des dérivés de P.A.S. — desquelles les propriétés anti-tuberculeuses ne furent pas ou incomplètement expérimentées, fût éprouvé avec l'expérience sur l'embryon de poule: Les graphiques dose-action, de streptomycine, de I.N.H. de P.A.S. et d'un certain nombre de dérivés de P.A.S. parurent ne pas différer entre eux d'une façon signifiante. L'efficacité de ces combinaisons put donc être exprimée en un seul chiffre, par lequel la demi-dose efficace fut choisie.

Pour le calcul de la demi-dose efficace d'une nouvelle combinaison, la déterminaison d'un point quelconque de la courbe dose-action suffit.

ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Den Hühnerembryotest von Lee und Stavitsky haben wir zu einer Routinemethode ausgearbeitet, wodurch es uns möglich wurde, in verhältnismässig kurzer Zeit und mit relativ geringen Kosten einen Eindruck von der antituberkulösen Wirkung chemischer Verbindungen zu bekommen. Wenn man diesen Test vor dem Meerschweinchen- oder Mäuseversuch ausführt, so können die beiden letztgenannten, recht teuren und zeitraubenden Versuche für diejenigen Stoffe reserviert bleiben, die im Hühnerembryotest bereits mehr oder weniger günstige Resultate ergeven haben und somit gute Erfolge erwarten lassen.

Das Prinzip der Hühnerembryotestes ist:

a) dass der Anstieg des Milzgewichtes vom Hühnerembryo bis zu einer bestimmten Grenze dem Ernst der tuberkulösen Infektion parallel läuft,

b) dass die antituberkulösen Eigenschaften eines Stoffes aus dessen Vermögen, den unter a) genannten Anstieg des Milzgewichtes zu unterdrücken, abzulesen sind.

Der Einfluss der Tuberkulostatica auf den tuberkulösen Prozess im Hühnerembryo wurde auch histologisch untersucht. Die Ausdehnung der histologischen Veränderungen gung parallel zum Anstieg des Milzgewichtes.

Eine Anzahl Stoffe – unter anderen P.A.S.-derivate –, wovon die antituberkulösen Eigenschaften bisher nicht oder nur onvollständig untersucht worden waren, wurden mit dem Hühnerembryotest untersucht. Die Dosis-Wirkungskurven von Streptomycin, I.N.H., P.A.S. und einer Reihe P.A.S.-derivate zeigten im Vergleich zueinander keine signifikanten Unterschiede. Die Wirksamkeit dieser Verbindungen konnte darum durch einen einzigen Wert ausgedrückt werden, wofür derjenige der halb wirksamen Dosis (medium effectif dose) gewählt wurde.

Zur Berechnung der halb wirksamen Dosis einer neuen Verbindung genügt die Bestimmung eines beliebigen Punktes der Dosis-Wirkungskurve.

LITERATUURLIJST

Beek v., C. en Haex, A. J. Ch.: De diagnostiek van acute haematogene tuberculose. Ned. Tijdschr. Geneesk., 1949, 93 : 2708.

Beek v., C. en Haex, A. J. Ch.: Specifieke afwijkingen in de lever bij lijders aan erythema nodosum. Ned. Tijdschr. Geneesk. 1948, 92 : 4171.

Beek v., C. en Haex, A. J. Ch.: Leverbiopsie als hulpmiddel bij de diagnose van vergrote klieren in de longhilus en het mediastinum. Ned. Tijdschr. Geneesk., 1949, 93 : 3465.

Beeuwkes, H.: Voorlopige mededeling over het bepalen van de gevoeligheid van tuberkelbacteriën tegen streptomycine. Ned. Tijdschr. Geneesk., 1950, 94 : 3347.

Debray, J. R.: Persoonlijke mededeling.

Debray, J. R.: Action du B. P. A. S. (sel sodique de l'acide benzoyl-orthoxyparaaminobenzoïque) dans la tuberculose urinaire. Pr. méd., 1950, 58 : 647.

Drea, W. F.: Growth of small numbers of tubercle bacilli, H37, in Long's liquid synthetic medium and some interfering factors. J. Bact., 1942, 44 : 149.

Drea, W. F.: Dephth growth of acid-fast bacilli in liquid media. Amer. Rev. Tuberc., 1946, 53 : 353.

Emmart, E. W. and Smith, M. I.: The growth and effects of the tubercle bacillus on the chorio-allantois membrane of the chick embryo: A method for studies in chemotherapy. Publ. Hlth Rep. Wash., 1941, 56 : 1277.

Feldman, W. H., Karlson, A. G. and Hinshaw, H. C.: Streptomycin-resistant tubercle bacilli. Effects of resistance on therapeutic results in tuberculous guinea pigs. Amer. Rev. Tuberc., 1948, 57 : 162.

Feldman, W. H.: Experimental evaluation of antibacterial agents in tuberculosis therapy. Irish J. med. Sci., 1951, 6e serie, 311 : 505.

Finney, D. J.: Probit Analysis. Cambridge University Press, 1945 and 1952. 2e druk.

Fite, G. L. and Olson, B. J.: The infectivity of myobacteria for chorioallantoic membranes of chick embryos. Publ. Hlth Rep. Wash. 1944, 59 : 1432.

Gootjes, J., Zwart Voorspuij, A. J. and Nauta, W. Th.: Investigation into the tuberculostatic activity of some aromatic hydroxy compounds. Antonie van Leeuwenhoek, 1953, 19 : 237.

Haex, A. J. Ch.: Aspiratieleverbiopsie en tuberculose. Aanwinsten op diagnostisch en therapeutisch gebied. 1951, 2e serie. 6, p. 73.

Haex, A. J. Ch.: De klinische betekenis van de aspiratieleverbiopsie. Proefschrift 1945, p. 68-120.

Haex, A. J. Ch.: and Van Beek, C.: Tuberculosis and aspiration liver biopsy. Haarlem De Erven F. Bohn N. V. 1955.

Haex, A. J. Ch. : De aspiratieleverbiopsie als hulpmiddel bij het vaststellen der haematogene tuberculose. Ned. Tijdschr. Geneesk., 1947, 91 : 902.

Hallberg, V. : A new method for staining tubercle bacilli, applicable also to the micro-organism of leprosy and other acid-fast germs. Acta med. scand., 1946, vol. 125, suppl. 180.

Hurni, H., Hirt, R. und Ragaz, L.: Die Wirkung von P. A. S. (p-Aminosalicylsäure) und P. A. S. -Derivaten auf die experimentelle Mäusetuberkulose. Zugleich ein Beitrag zur Methodiek der experimentellen Mäusetuberkulose. Schweiz. Z. Path. Bakt., 1951, 14 : 17.

Hurni, H. : Uber die quantitativen Verhältnisse beim Antagonismus zwischen p-Aminosalicylsäure (PAS) und p-Aminobenzoësäure (PABA) Schweiz. Z. Path. Bakt., 1949, 12 : 282.

Koch, M. und Rabinowitsch, L. : Die Tuberkulose der Vögel und ihre Beziehungen zur Säugetiertuberkulose. Virchows Arch. 1907. Beiheft zum 190 Bande p. 246.

Koelzer, P. P. und Giesen, J. : Untersuchungen zur Toxität der p-Aminosalicylsäure und ihrer Derivate. Z. Naturforsch., 1951, 6b : 183.

Lee, H. F. and Stavitsky, A. B. : Intravenous infection of the chick embryo with tubercle bacilli. Amer. Rev. Tuberc., 1947, 55 : 262.

Lee, H. F., Stavitsky, A. B. and Lee, M. P. : A chick embryo technic for intravenous and chemotherapeutic studies. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., 1946, 61 : 143.

Lee, H. F. : Use of the chick embryo for preliminary in vivo evaluation of tuberculostatic substances. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, 52 : 692.

Mackaness, G. B. and Smith, N. : The action of isoniazid (isonicotinic acid hydrazide) on intracellular tubercle bacilli. Amer. Rev. Tuberc., 1952, 66 : 125.

Maffucci, A. : Die Hühnertuberculose. Z. Hyg. Infectkr., 1892, 11 : 445.

Markham, N. P. and Florey, H. W. : The effect on experimental tuberculosis of the intravenous injection of insoluble substances: Experiments with carbon. Brit. J. exp. Path., 1951, 32 : 25.

Moore, M. : Reaction of chorio-allantoic membrane of developing chick to inoculation with some mycobacteria. Bull. Acad. Tuberc. Physicians., 1941, 5 : 83.

Polk, A., Buddingh, G. J. and Goodpasture, E. W. : An experimental study of complement and hemolytic amboceptor introduced into chick embryos. Amer. J. Path., 1938, 14 : 71.

Steenken, Jr. W. and Wolinsky, E. : Streptomycin in experimental tuberculosis II Response in guinea pigs infected with strains of varying degrees of streptomycin resistance. Amer. Rev. Tuberc., 1948, 58 : 353.

Steenken, W. and Wolinsky, E.: In vitro and -vivo antituberculous activity of terramycin and viomycin. 9e Strept. Conf., 1950, Veterans Administration.

Youmans, G. P., Youmans, A. S. and Osborne, R. R.: Tuberculostatic action of chloromycetin in vitro and in vivo. Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., 1948, 67 : 426.

Youmans, G. P.: Comperative effectiveness of chemotherapeutic agents upon experimental tuberculosis of mice. 9e Strept. Conf., 1950, p. 198. Veterans Administration.

Tabel no. 1

Verschilpunten met de techniek volgens Lee en Stavitsky.

Onderdeel	Lee en Stavitsky	Schrijver
Stam.	A 27 (Phipps). matig virulente humane stam.	H37Rv virulente humane stam.
Tijdstip van infectie	12e dag.	11e dag.
Vrij prepareren van de chorio-allantois membraan.	met behulp van een druppel physiologisch zout. Verwijdering van het gehele schaalvlies.	zonder Klein gedeelte.
Bloedstelping	Gelfoam en thrombine poeder als routine.	Slechts in bijzondere gevallen.
Openen van de luchtkamer.	Geheel.	Klein gedeelte.
Sluiten van de luchtkamer.	Met 3 lagen Scotch Tape.	1 laag Scotch Tape.
Gemiddeld miltgewicht.	± 32 mg;	± 42 mg.
Mortaliteit.	25-30%.	30-50%.

Tabel no. 2

Onderzochte stof : Penicilline
Dosis/ei : 10.000 E
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : H37Rv

Miltgewichten in mg

	H37Rv	H37Rv + Penicilline
	28.5	66.8
	35.8	22.7
		23.3
		22.5
		33.8
		30.6
Gem. gewicht:	31.4	33.9

Tabel no. 3

Onderzochte stof: Streptomycine
Dosis/ei : 250 γ
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Miltgewichten in mg.

Groep:	A	B	C
	24.0	20.4	10.3
	35.0	7.2	9.6
	94.0	13.8	14.6
	42.0	20.4	11.2
	27.2	59.0	9.8
	28.0	9.8	13.7
	134.5	9.8	9.0
	67.6	6.8	9.8
		12.8	9.2
		3.0	10.6
		14.0	7.5
		47.6	8.7
		14.1	12.6
		11.8	
		13.1	
		6.7	
		23.2	
		13.6	
		11.3	
		5.8	
		9.3	
		9.9	
		6.4	
		15.0	
		14.1	
		8.2	
		14.3	
		3.2	
		5.0	
Gem. gew. :	56.5 ± 14.0	14.1 ± 2.2	10.5 ± 0.6
Ingesp. :	25 eieren	62 eieren	21 eieren
Overgebl. :	8 "	29 "	13 "

Het verschil tussen de eerste en tweede kolom is significant, de overschrijdingskans is $< 1\%$.

Tabel no. 4

Onderzochte stof: Streptomycine
Dosis/ei : 2.000 γ
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Miltgewichten in mg.

Groep	A	B	C
	91.8	8.4	9.4
	80.0	10.0	13.4
	104.0	10.0	11.6
	62.4	23.4	10.0
	65.4	3.4	10.0
	110.4	10.0	7.6
	30.8	8.6	
	141.6	12.4	
	41.8	14.0	
	59.0	16.6	
		9.8	
		9.4	
Gem. gew. :	78.7 ± 10.7	11.3 ± 1.4	10.3 ± 0.8
Ingesp. :	22 eieren	24 eieren	8 eieren
Overgebl. :	10 "	12 "	6 "

Het verschil tussen de eerste en tweede kolom is significant, de overschrijdingskans is < 1%.

Tabel no. 5

Onderzochte stof: Streptomycine.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
7.500 γ	Aant. waarn.	21	12	22
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	55.2 ± 6.4	9.3 ± 1.3	8.2 ± 0.6
	Overschrijdings kans		< 1%	
3.500 γ	Aant. waarn.	9	12	4
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	30.7 ± 3.2	14.7 ± 2.9	7.6 ± 0.9
	Overschrijdings kans		< 1%	
2.000 γ	Aant. waarn.	10	12	6
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	78.7 ± 10.7	11.3 ± 1.4	10.2 ± 0.8
	Overschrijdings kans		< 1%	
1.000 γ	Aant. waarn.	12	19	15
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	46.1 ± 7.1	15.0 ± 2.3	12.1 ± 0.8
	Overschrijdings kans		< 1%	
250 γ	Aant. waarn.	8	29	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	56.5 ± 14.0	14.1 ± 2.3	10.5 ± 0.6
	Overschrijdings kans		1%	
100 γ	Aant. waarn.	17	39	23
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	55.5 ± 6.4	39.9 ± 5.3	11 ± 0.6
	Overschrijdings kans		7%	
50 γ	Aant. waarn.	18	51	11
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	32.4 ± 3.4	30.3 ± 2.5	11.0 ± 0.5
	Overschrijdings kans		62%	

Tabel no. 6

Onderzochte stof: P. A. S.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
10.000 γ	Aant. waarn.	19	15	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	43.2 ± 3.4	10.8 ± 1.2	11.1 ± 1.7
	Overschrijdings kans		<1%	
1.000 γ	Aant. waarn.	22	17	23
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	35.9 ± 3.2	10.2 ± 0.1	9.7 ± 0.1
	Overschrijdings kans		<1%	
250 γ	Aant. waarn.	9	24	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	33.1 ± 2.6	12.5 ± 0.7	12.0 ± 0.7
	Overschrijdings kans		<1%	
100 γ	Aant. waarn.	8	16	4
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	49.0 ± 8.4	24.6 ± 3.5	8.2 ± 0.9
	Overschrijdings kans		2%	
50 γ	Aant. waarn.	13	14	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	55.1 ± 8.6	30.5 ± 4.0	15.2 ± 3.0
	Overschrijdings kans		<5%	
20 γ	Aant. waarn.	11	28	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	58.9 ± 9.4	52.1 ± 6.5	10.0 ± 0.4
	Overschrijdings kans		55%	
10 γ	Aant. waarn.	12	19	16
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	36.9 ± 7.0	47.4 ± 8.2	12.5 ± 0.7
	Overschrijdings kans		30%	

Tabel no. 7

Onderzochte stof: B.S. 709 = Benzoyl-amino-salicylzuur
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
10.000 γ	Aant. waarn.	9	8	5
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	34.0 ± 6.3	7.4 ± 0.6	8.1 ± 1.6
	Overschrijdings kans		< 1%	
50 γ	Aant. waarn.	16	17	12
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	61.0 ± 8.6	35.9 ± 6.2	9.3 ± 0.7
	Overschrijdings kans		3%	
20 γ	Aant. waarn.	18	34	10
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	56.2 ± 7.9	25.7 ± 7.4	12.0 ± 0.8
	Overschrijdings kans		1%	

Tabel no. 8

Onderzochte stof: Tubercazon (4-Acetyl-amino-benzaldehyd-thiosemicarbazon.)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
30 γ	Aant. waarn.	7	7	4
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	53.1 ± 5.9	37.2 ± 5.6	9.7 ± 1.5
	Overschrijdings kans		7%	
10 γ	Aant. waarn.	6	13	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	37.7 ± 7.3	29.3 ± 2.8	8.4 ± 1.2
	Overschrijdings kans		31%	

Tabel no. 9

Onderzochte stof: I.N.H. (Iso-nicotinyl-hydrazide.)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
500 >	Aant. waarn.	12	25	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	60.3 ± 7.5	13.6 ± 0.6	11.4 ± 0.9
	Overschrijdings kans		< 1%	
250 γ	Aant. waarn.	8	17	8
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	28.3 ± 3.8	14.8 ± 0.8	7.2 ± 0.1
	Overschrijdings kans		< 1%	
145 γ	Aant. waarn.	31	28	8
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	33.6 ± 3.0	19.4 ± 3.1	12.3 ± 1.3
	Overschrijdings kans		< 1%	
100 γ	Aant. waarn.	10	20	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	37.2 ± 3.2	34.4 ± 2.9	10.2 ± 0.8
	Overschrijdings kans		52%	
50 γ	Aant. waarn.	4	17	8
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	31.7 ± 1.9	43.1 ± 3.5	11.6 ± 1.1
	Overschrijdings kans		1%	

Tabel no. 10

Gevoeligheidsbepaling:		in vitro Yo = Youmans Be = Beeuwkes P. S. = Patientenstam			in vivo Eiproef Proefdos. 250 γ /ei Overschr. kans	
		$H_{37}Rv$	P. S.	Rav.		
BS 606 R: CH_2ClCO- Mono-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	Yo Be	5 γ 5 γ		25 γ 5 γ	3%	+
BS 607 R: $CHCl_2CO$- Di-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	Yo Be	1 γ 1 γ	1 γ 0.5 γ		<1%	+
BS 608 R: CCl_3CO- Tri-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	Yo Be	2 γ 2 γ	2 γ 2 γ		<1%	+
BS 757 R: CH_3CO- Acetyl-amino-salicylzuur	Yo Be	8 γ 8 γ	8 γ 25 γ	25 γ 25 γ	3%	+
BS 833 R: CH_3CCl_2CO- α-Di-chloor-propionyl-amino-salicylzuur.	Yo Be	5 γ 2 γ	2 γ		1%	+
BS 834 R: CH_2BrCO- Mono-broom-acetyl-amino-salicylzuur	Yo Be	5 γ 8 γ	8 γ 5 γ		31%	-
BS 873 R: $CH_3CH_2CHBrCO$- α-Broom-butycyl-amino-salicylzuur	Yo Be	8 γ 5 γ		25 γ 5 γ	1%	+
BS 874 R: $CH_3CH_2CH_2CH_2$-CHBrCO-α-Broom-caproyl-amino-salicylzuur	Yo Be	5 γ 5 γ		25 γ 5 γ	8%	-
BS 1026 p. Amino-salicylzuur-hydrazide	Yo Be	2 γ 25 γ		5 γ	8%	-
BS 1079 p. Amino-benzoëzuur	Be	>100γ			>10%	

Tabel no. 10

Gevoeligheidsbepaling:		in vitro Yo = Youmans Be = Beeuwkes P.S. = Patientenstam			in vivo Eiproef Proefdos. 250 γ/ei Overschr. kans
		$H_{37}Rv$	P.S.	Rav.	
Bs 683 5 Jood-4-amino-salicylzuur	Yo Be	5 γ 25 γ	8 γ 25 γ		2% +
BS 774 Ortho-amino-phenol	Yo Be	5 γ 5 γ	0.25γ 2 γ	1 γ 5 γ	100% -
BS 649 2-amino-4-hydroxy-isophtaal-zuur.	Yo Be	25 γ 5 γ	5 γ 5 γ		100% -
BS 681 4-6-dioxyisophtaalzuur	Yo Be	8 γ 8 γ			88% -
BS 664 4-Acetyl-amino-2-broom-benzaldehyde-thiosemicar-bazon	Be	2 γ	1γ		(100% mor-taliteit.)
BS 665 4-Acetyl-amino-benzalde-hyde-thiosemicarbazon.	Yo Be	0.5 γ 1 γ		2 γ	bij 50 γ 100% (Bij 250 100% morta-liteit).
BS 666 4-Succinyl-amino-benzalde-hyde-thiosemicarbazon	Yo Be	25 γ 5 γ	25γ 8γ	25 γ	(100% mor-taliteit).
BS 892 Hydroxychinoline	Yo Be	2 γ 5 γ		2γ 5 γ	(100% mor-taliteit).

De resultaten van de eiproef zijn uitgedrukt in de overschrijdingskans. Een overschrijdingskans van 5% of minder betekent een significante werking = + .

Tabel no. 11

Onderzochte stof: I.N.H.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : Ravenel-stam

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	6	13	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	28.5	28.5	11.9
	Overschrijdings kans		100%	
500 γ	Aant. waarn.	10	20	17
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	35.5 ± 3.1	31.5 ± 3.2	12.3 ± 0.6
	Overschrijdings kans		30%	

Tabel no. 12

Onderzochte stof: P.A.S.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : P.A.S.-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	7	19	11
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	73.3 ± 15.0	71.4 ± 10.0	12.7 ± 0.8
	Overschrijdings kans		90%	

Onderzochte stof: Streptomycine
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : Streptomycine-resistente $H_{37}Rv$ (1000 γ/ml)

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	10	26	9
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	92 ± 14.4	68.2 ± 5.8	13.5 ± 0.4
	Overschrijdings kans		87%	

Tabel no. 13

Onderzochte stof: I.N.H.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : Streptomycine-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	8	25	4
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	93.8 ± 9.6	37.9 ± 4.9	12.2 ± 2.2
	Overschrijdings kans		< 1%	
500 γ	Aant. waarn.	11	18	8
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	45.1 ± 4.9	15.4 ± 1.7	15.4 ± 1.3
	Overschrijdings kans		< 1%	

Tabel no. 14

Onderzochte stof: P.A.S. & Streptomycine
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : Streptomycine-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	8	20	5
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	63.3 ± 9.1	16.5 ± 1.6	9.2 ± 1.1
	Overschrijdings kans		< 1%	

Onderzochte stof: P.A.S.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : Streptomycine-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	7	11	6
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	39.2 ± 13.6	12.9 ± 0.8	10.7 ± 1.3
	Overschrijdings kans		7%	

Tabel no. 14

Onderzochte stof: I.N.H.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : P.A.S.-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	9	13	11
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	42.7 ± 8.8	16.8 ± 1.7	12.2 ± 0.7
	Overschrijdings kans		<1%	

Tabel no. 15

Onderzochte stof: BS 606 (mono-chloor-acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	7	6	2
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	67.1 ± 19.9	15.1 ± 4.4	4.5 ± 0.4
	Overschrijdings kans		3%	
100 γ	Aant. waarn.	31	49	9
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	50.0 ± 1.7	32.5 ± 5.4	10.3 ± 0.8
	Overschrijdings kans		1%	
50 γ	Aant. waarn.	5	13	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	29.8 ± 2.6	18.3 ± 5.0	10.4 ± 1.3
	Overschrijdings kans		5%	
20 γ	Aant. waarn.	12	21	10
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	74.6 ± 17.9	67.3 ± 9.0	12.9 ± 1.2
	Overschrijdings kans		73%	

Tabel no. 16

Onderzochte stof: BS 607 (di-chloor-acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis /ei		Groep A	Groep B	Groep C
5.000γ	Aant. waarn.	6	5	2
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	21.6 ± 4.1	7.7 ± 1.6	12.0 ± 4.0
	Overschrijdings kans		<1%	
1.000γ	Aant. waarn.	9	10	2
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	85.6 ± 15.3	14.3 ± 3.0	14.7 ± 1.3
	Overschrijdings kans		<1%	
500γ	Aant. waarn.	14	8	6
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	39.2 ± 5.2	11.8 ± 2.5	10.1 ± 1.2
	Overschrijdings kans		<1%	
250γ	Aant. waarn.	24	32	15
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	45.0 ± 3.5	23.0 ± 4.5	10.0 ± 1.0
	Overschrijdings kans		<1%	
100γ	Aant. waarn.	18	30	21
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	77.4 ± 10.7	30.6 ± 3.3	13.1 ± 0.6
	Overschrijdings kans		<1%	
50γ	Aant. waarn.	7	22	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	42.1 ± 3.3	29.9 ± 3.4	13.3 ± 1.1
	Overschrijdings kans		2%	
20γ	Aant. waarn.	31	50	45
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	59.9 ± 9.4	40.0 ± 3.7	12.2 ± 0.6
	Overschrijdings kans		5%	
10γ	Aant. waarn.	7	14	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	57.8 ± 17.1	42.9 ± 4.6	14.6 ± 0.6
	Overschrijdings kans		41%	

Tabel no. 17

Onderzochte stof: BS 608 (tri-chloor-acetyl-amino-salicylzuur).
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
1.000 γ	Aant. waarn.	11	25	11
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	49.5 ± 10.7	11.8 ± 0.9	10.8 ± 1.1
	Overschrijdings kans		< 1%	
500 γ	Aant. waarn.	18	17	11
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	51.6 ± 6.6	12.6 ± 1.5	11.9 ± 1.4
	Overschrijdings kans		< 1%	
250 γ	Aant. waarn.	11	25	16
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	44.8 ± 7.0	19.6 ± 1.6	13.5 ± 1.6
	Overschrijdings kans		< 1%	
100 γ	Aant. waarn.	21	29	12
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	42.3 ± 3.7	27.6 ± 3.3	11.7 ± 1.1
	Overschrijdings kans		< 1%	
50 γ	Aant. waarn.	15	16	12
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	49.7 ± 10.9	22.5 ± 3.0	13.4 ± 1.4
	Overschrijdings kans		< 1%	
20 γ	Aant. waarn.	6	15	9
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	63.8 ± 9.6	48.1 ± 6.0	9.6 ± 0.9
	Overschrijdings kans		20%	

Tabel no. 18

Onderzochte stof: BS 757 (Acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	16	27	12
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	57.7 ± 10.0	30.1 ± 6.2	13.4 ± 1.6
	Overschrijdings kans		3%	
100 γ	Aant. waarn.	28	29	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	42.7 ± 4.1	26.6 ± 3.0	16.0 ± 2.4
	Overschrijdings kans		< 1%	
50 γ	Aant. waarn.	15	33	18
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	50.0 ± 7.8	24.1 ± 4.7	10.9 ± 0.9
	Overschrijdings kans		< 1%	
20 γ	Aant. waarn.	10	16	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	69.0 ± 10.8	58.4 ± 12.1	12.0 ± 0.7
	Overschrijdings kans		60%	

Tabel no. 19

Onderzochte stof: BS 873 (α-broom-butycyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	8	14	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	43.7 ± 5.9	11.3 ± 2.9	13.0 ± 0.8
	Overschrijdings kans		< 1%	
100 γ	Aant. waarn.	9	10	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	41.3 ± 4.5	24.1 ± 2.8	13.0 ± 0.8
	Overschrijdings kans		< 1%	
50 γ	Aant. waarn.	14	23	16
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	52.8 ± 3.8	43.2 ± 3.2	13.1 ± 0.9
	Overschrijdings kans		8%	

Tabel no. 20

Onderzochte stof: BS 833 (α-di-chloor-propionyl-amino-salicyl-zuur).
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	3	5	5
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	29.3 ± 2.1	14.2 ± 0.6	12.0 ± 0.7
	Overschrijdings kans		< 1%	
100γ	Aant. waarn.	10	15	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	43.3 ± 5.4	40.4 ± 7.1	10.2 ± 0.9
	Overschrijdings kans		75%	

Tabel no. 21

Onderzochte stof: BS 874 (α-broom-caproyl-amino-salicylzuur).
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250γ	Aant. waarn.	6	13	13
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	33.0 ± 2.9	25.2 ± 3.2	11.4 ± 0.2
	Overschrijdings kans		8%	

Tabel no. 22

Onderzochte stof: BS 683 (5-Jood-4-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250γ	Aant. waarn.	4	5	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	30.8 ± 6.5	11.6 ± 0.8	12.1 ± 1.5
	Overschrijdings kans		2%	
100γ	Aant. waarn.	14	35	29
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	41.6 ± 5.3	15.8 ± 3.2	10.8 ± 0.5
	Overschrijdings kans		1%	

Tabel no. 23

Onderzochte stof: Phthiocol.
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
500γ	Aant. waarn.	28	25	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	56.2 ± 10.4	43.8 ± 6.5	12.7 ± 1.6
	Overschrijdings kans		42%	

Tabel no. 24

Onderzochte stof: Chlooramphenicol
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
5.000 γ	Aant. waarn.	14	8	7
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	56.7 ± 9.9	47.2 ± 8.9	12.7 ± 2.7
	Overschrijdings kans		60%	

Onderzochte stof: Oxytetracycline
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	13	22	16
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	38.6 ± 3.9	52.9 ± 9.7	10.1 ± 2.3
	Overschrijdings kans		± 15%	

Tabel no. 25

Onderzochte stof: BS 606: (Mono-chloor-acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : PAS-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	5	10	1
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	87.9 ± 36.4	51.0 ± 8.2	12.5
	Overschrijdings kans		30%	

Onderzochte stof: BS 607: (Di-chloor-acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : PAS-resistentie $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	11	24	14
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	48.7 ± 7.8	33.9 ± 2.8	13.9 ± 0.9
	Overschrijdings kans		7%	

Onderzochte stof: BS 608: (Tri-chloor-acetyl-amino-salicylzuur)
Inoculum : 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : PAS-resistente $H_{37}Rv$

Dosis/ei		Groep A	Groep B	Groep C
250 γ	Aant. waarn.	10	16	10
	Gemiddeld milt gewicht in mg.	54.7 ± 9.6	49.4 ± 6.3	10.3 ± 0.6
	Overschrijdings kans		65%	

Tabel no. 26

Microscopisch onderzoek van de lever van het 20-dagen oude kippenembryo.

Inoculum: 2.000.000 tuberkelbacteriën
Stam : $H_{37}Rv$

Maximaal werkzame dosis		Tuberculeuze afwijkingen in de lever	
		Groep A	Groep B
P.A.S.	: 5.000 γ : 1.000 γ	++++	±
Streptomycine:	7.500 γ 1.000 γ	++++	±
I.N.H.	: 500 γ	++++	+
Half werkzame dosis			
P.A.S.	: 100 γ	++++	+ à ++
Streptomycine:	100 γ	++++	++
I.N.H.	: 145 γ	++++	++ à +++
Minimaal werkzame dosis			
P.A.S.	: 20 γ	++++	++++
Streptomycine:	50 γ	++++	++++
I.N.H.	: 50 γ	++++	++++

++++: Talrijke granulomen vnl. van het type III en IV met necrose en talrijke tuberkelbacteriën.
+++ : De tuberculeuze afwijkingen zijn minder uitgebreid. Ook hier granulomen van het type III en IV, maar minder talrijk.
++ : Nog enkele sporadisch voorkomende granulomen van het type III.
+ : Na lang zoeken wordt nog een enkel granuloompje waargenomen.
± : Geen tuberculeuze weefsel veranderingen. Wel worden nog enkele tuberkelbacteriën gezien.

Tabel no. 27

Microscopisch onderzoek van de lever van het 20-dagen oude kippenembryo.

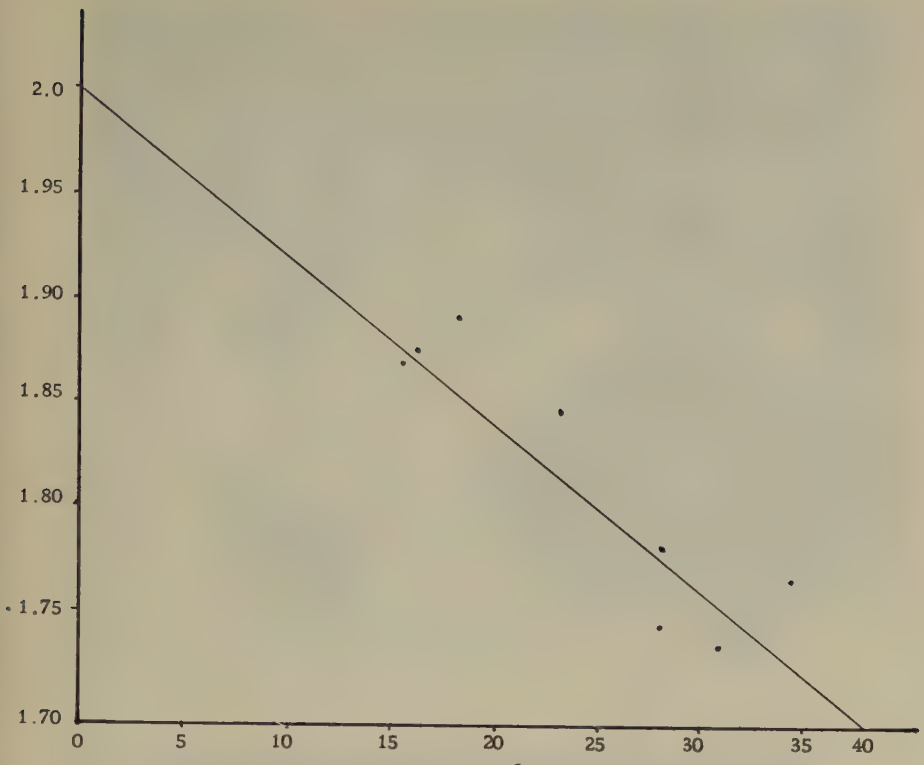
Inoculum: 2.000.000 tuberkelbacteriën.
Stam : $H_{37}Rv$

Proefdosis: 250 γ /ei	Tuberculeuze afwijkingen in de lever	
	Groep A	Groep B
P.A.S.	++++	+
I.N.H.	++++	++ à +++
Mono-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	++++	+
Di-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	++++	+
Tri-chloor-acetyl-amino-salicylzuur	++++	+
Acetyl-amino-salicylzuur	++++	+
Oxytetracycline	++++	++++
Chlooramphenicol (5.000 γ/ei)	++++	+++

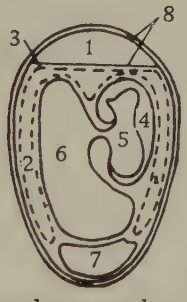
++++: Talrijke granulomen vnl. van het type III en IV met necrose en talrijke tuberkelbacteriën.
+++ : De tuberculeuze afwijkingen zijn minder uitgebreid. Ook hier granulomen van het type III en IV, maar minder talrijk.
++ : Nog enkele sporadisch voorkomende granulomen van het type III.
+ : Na lang zoeken wordt nog een enkel granuloompje waargenomen.

Tabel no. 28

Stof	a	d	m	u	w_m	w_u	χ^2	N	P
Strepto-mycine	1,710 1,760 1,620	0,660 0,750 0,534	2,036	0,068	3,25	0,83	0,27	1	0,60
I.N.H.	1,628 1,470 1,462 1,739	0,632 0,444 0,545 0,705	2,208	0,371	9,95	4,22	3,69	2	0,15
P.A.S.	1,730 1,640 1,708 1,510	0,729 0,529 0,748 0,407	1,897	0,561	4,71	1,72	3,09	2	0,25
Monochloor-acetyl-aminosali-cylzuur	1,887 1,379 1,628 1,735	0,794 0,407 0,634 0,998	1,920	0,706	7,82	2,36	3,84	2	0,25
Dichloor-acetyl-aminosali-cylzuur	1,690 1,597 1,809 1,652 1,544	0,619 0,492 0,708 0,531 0,590	2,005	1,162	2,64	0,37	3,52	3	0,40
Trichloor-acetyl-aminosali-cylzuur	1,784 1,536 1,627 1,625 1,610	0,824 0,446 0,551 0,532 0,597	1,949	0,739	3,47	1,02	6,13	3	0,15
Acetyl-aminosali-cylzuur	1,865 1,555 1,595 1,595 1,549 1,256 1,752	0,781 0,583 0,570 0,392 0,437 0,322 0,543	1,908	1,495	1,19	0,08	8,78	5	0,12
Broom-butycyl-aminosali-cylzuur	1,709 1,585 1,624	0,608 0,489 0,530	2,098	0,421	3,87	1,70	0,22	1	0,60
Gemiddeld:			2,032	0,515					
Som:					36,90	12,30	29,54	19	0,06

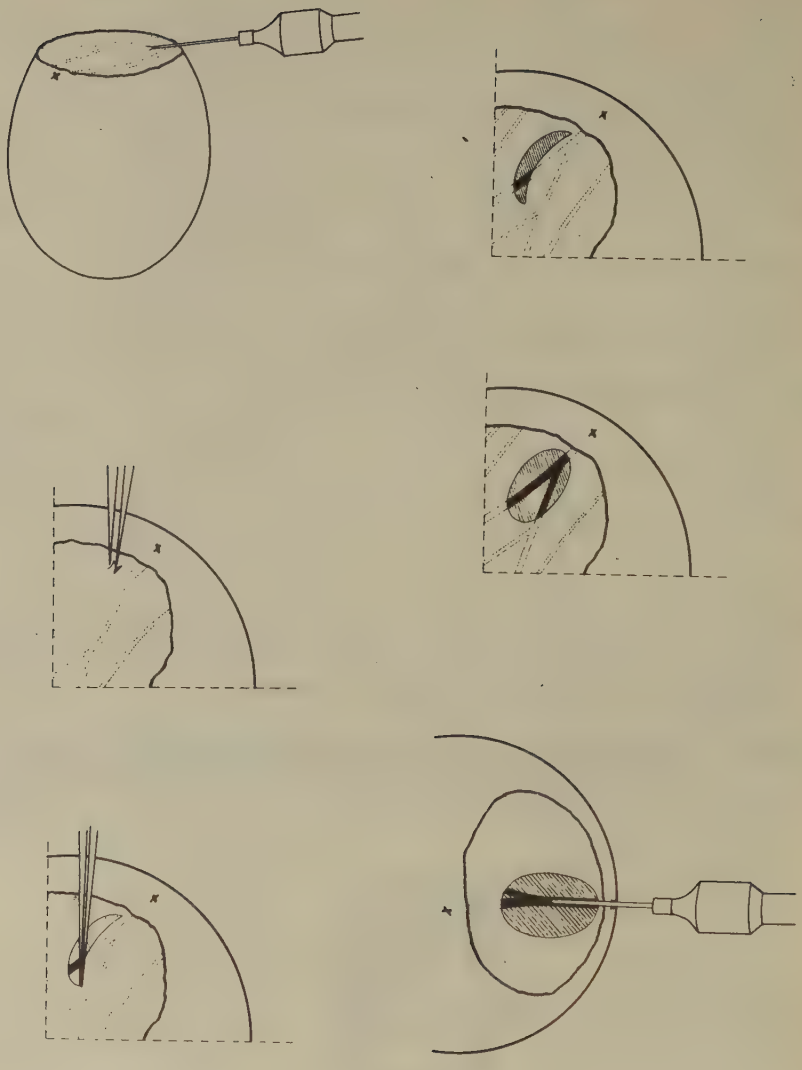


Grafiek 1: LJkings-curve van de foto-colorimetrische bepaling van tuberkelbacteriën-concentraties in suspensies.



Figuur 1. Schematische doorsnede van een bevrucht kippenei.

1. luchtkamer
2. chorio-allantois-zak met
3. chorio-allantois-membraan
4. amnionholte
5. embryo
6. dooierzak
7. albumen
8. schaalvlies



Figuur 2.A tot en met F: Techniek van de intraveneuze injectie.

Foto 1. Bereiding van de suspensie van tuberkelbacteriën.

Foto 2. De inspectie van de luchtkamer en het verloop van de bloedvaten van het ongeopende ei.

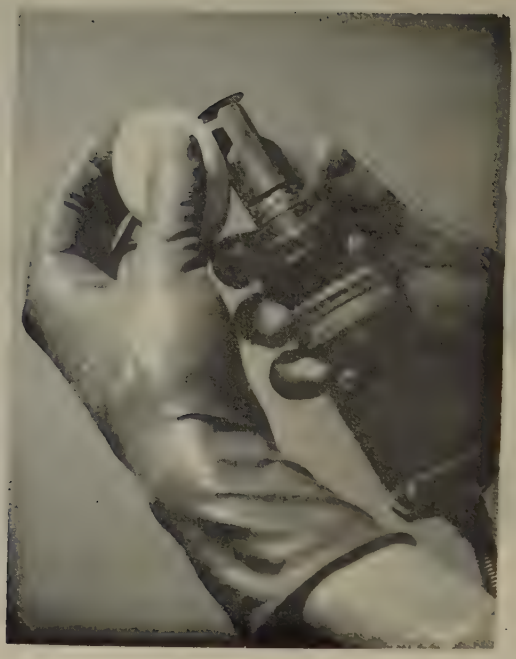


Foto 3. Het aanboren van de luchtkamer.

Foto 4. De vaattekening is door het schaalvlies heen zichtbaar.
(Ter verduidelijking is hier de gehele luchtkamer geopend).

Foto 5. Het los prepareren van het schaalvlies.

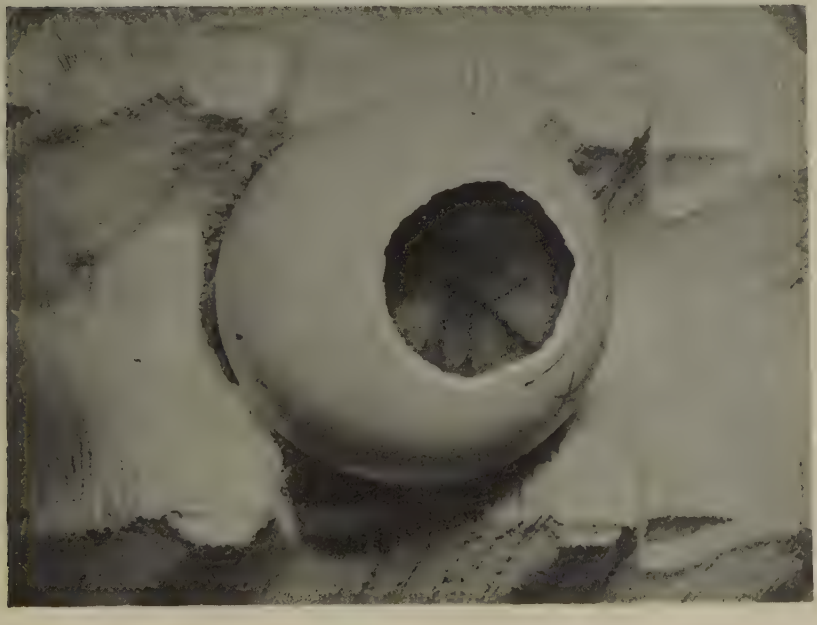


Foto 6. De geheel vrij geprepareerde Chorio-allantois membraan. (Volledig geopende luchtkamer).

Foto 7. **Intraveneuze injectie.**

Foto 8. Sectie van net embryo.
Vrij prepareren van de gezwollen milt.

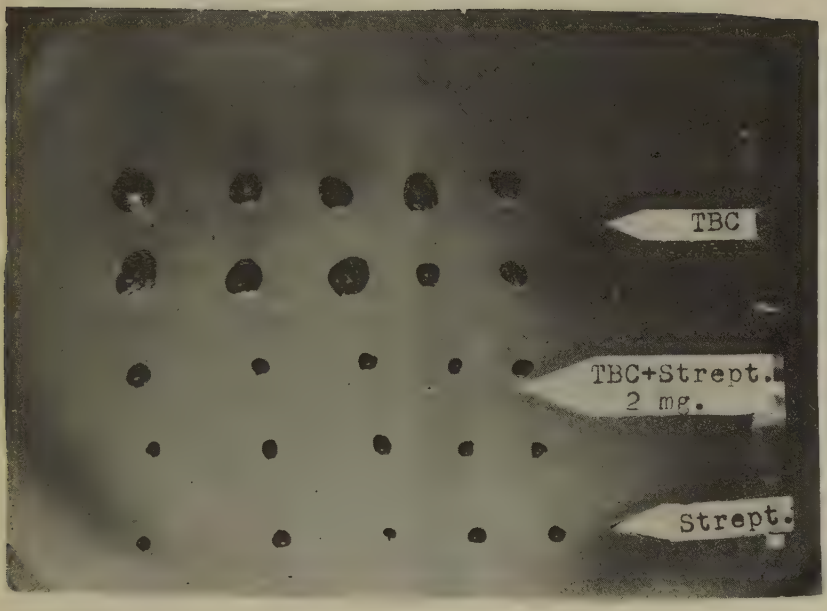


Foto 9. Milten van embryonen van de A, B en C.groep.
Dosering van het streptomycine 2000 γ/ei.

Daar de standaardafwijkingen van de miltgewichten per serie recht evenredig bleken te zijn met de seriegemiddelden, werd besloten met de logarithmen van de miltgewichten te werken. Het evenredig verband tussen de gemiddelde en standaardafwijking verdwijnt door met logarithmen te werken. De berekeningen worden dan eenvoudiger. De nauwkeurigheid van een gemiddelde hangt nu alleen nog maar af van het aantal waarnemingen. Het kwadraat van de standaardafwijking van een gemiddelde is omgekeerd evenredig met het aantal waarnemingen. De evenredigheidsfactor kan met grote nauwkeurigheid berekend worden door combinering van alle standaardafwijkingen binnen de series.

Voor de drie groepen werden de volgende varianties en vrijheids graden gevonden:

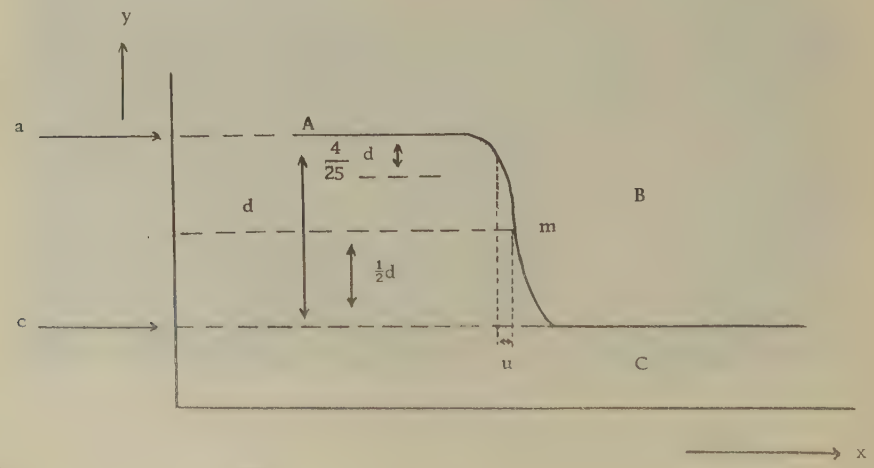
Per waarneming	Groep	σ^2	N
	A	0,0473	201
	B	0,0573	700
	C	0,0238	158

Dat de waarde van σ^2 bij groep C het kleinste en bij groep B het grootste is, laat zich verklaren, wanneer men aanneemt, dat zowel het inspuiten van tuberkelbacteriën als het daarop volgend toedienen van het geneesmiddel, bronnen van variatie van de miltgewichten zijn. Wanneer men een extra grote dosis geneesmiddel inspuit, zou men de waarde van groep C verwachten. In het laatste geval (groep C) is het gewicht niet gelijk gesteld aan het aantal eieren, maar is het tweemaal zo groot genomen. De variantie in groep C was n.l. veel kleiner dan in de groepen A en B. Ook de variantie van groep A was lager dan die van groep B, maar omdat de variantie van groep A niet binnen de series constant bleek te zijn werd er voorzichtigheidshalve geen groter gewicht per waarneming aan toegekend. Als variantie voor een waarneming of een schatting met een gewicht, w = 1, werd voor alle groepen de waarde $\sigma^2 = 0{,}0573$ aangehouden. Voor schattingen met andere gewichten wordt de standaardfout dus gesteld op $\frac{0{,}0573}{w}$

Inderdaad leverden een viertal series uit groep B met een overmatige dosis (1 mg P.A.S., 10 mg P.A.S., 1 mg trichlooracetyl-P.A.S. en 10 mg benzoyl-P.A.S.) een gemiddelde waarde van σ^2 op overeenkomende met die voor groep C.

Men kan a priori verwachten, dat het gemiddelde van de logarithmen der miltgewichten in groep B bij een zeer lage dosis, afgezien van de toevallige schommelingen, op het peil van groep A zal liggen en bij een voortdurende toeneming van de dosis tenslotte het peil van groep C zal bereiken. De dosiswerkingscurve, waarbij op de Y-as de gemiddelden van de logarithmen van de miltgewichten en op de X-as de logarithmen van de bijbehorende dosis worden afgezet, zal naar alle waarschijnlijkheid een sigmoide gedaante hebben. Dergelijke sigmoiden werden in de literatuur talrijke malen vermeld en veelal konden deze voor practische doeleinden wiskundig worden voorgesteld door een z.g. cumulatief normale curve. De vorm van de werkingscurve wordt dus bepaald door de formule van de cumulatieve normale kansverdeling, hoewel deze werkingscurve niets met een normale kansverdeling te maken heeft.

Het is mogelijk gebleken onze resultaten binnen de grenzen, die door de berekenbare toevallige fouten daaraan gesteld werden, met de genoemde wiskundige curve in overeenstemming te brengen.



De bovengrens a is het niveau van de logarithmen van de miltgewichten (y) van de groep A (de dosis = 0). De ondergrens c is het niveau voor y in groep C. De miltgewichten worden hier dus geacht te reageren alsof de gebruikelijke hoeveelheid tuberkelbacteriën was ingespoten en een zeer grote dosis van een werkzaam geneesmiddel was toegediend ($x = \infty$).

De niveau's van a en c kunnen van dag tot dag veranderen en moeten dus voor iedere gelijktijdige ingezette proefserie afzonderlijk worden geschat.

Het niveau voor groep B ligt in het algemeen op het hellende gedeelte van de werkingscurve, dus tussen a en c.

Het centrum m heeft een x-waarde, die overeenkomt met de „halfwerkzame dosis". Het ligt precies halverwege tussen a en c. In de figuur is dit aangegeven door de verticale afstand $\frac{1}{2}$ d tot de ondergrens c, waarbij d de afstand tussen beide grenzen weergeeft. De „standaarddeviatie" u is de horizontale afstand tot m voor een punt op de werkingscurve, dat correspondeert met een niveau, dat op een verticale afstand van $\frac{4}{25}$ d van één der grenzen a of c af ligt. Zoekt men

n.l. in een tabel voor de normale verdeling de linkse cumulatieve frequentie op, die behoort bij een afwijking t = -1, dan vindt men P = 0,1587 of ongeveer $\frac{4}{25}$. De waarden u en m worden

voor ieder geneesmiddel afzonderlijk geschat. Als m bekend is kan daaruit de halfwerkzame dosis in gamma's worden berekend met de formule M.E.D. (= medium effectif dose) = 10^m.

Als a, d, u, m en x gegeven zijn, kan men daaruit dus het niveau Y van de logarithmen van de miltgewichten berekenen.

We geven nu een kort overzicht van de toegepaste statische techniek. Deze gaat uit van de door R.A. Fisher ontwikkelde z.g. "maximum-likelihoodmethod", waarbij de onbekende constanten zodanig worden geschat, dat het resultaat de grootst mogelijke graad van waarschijnlijkheid bezit. De methode is o.a. beschreven door D.J. Finney in "Probit Analysis", tweede druk, Cambridge, 1952, pag. 246 e.v. De aangegeven methode werd nu op het bovenbeschreven model toegepast.

Men begint met de ruwe schattingen voor a_o, d_o, u_o en m_o, dus voor alle onbekende constanten. Voor a en d vinden wij deze gemakkelijk uit de gemiddelden $\bar{y}$ van de groepen A en C. Vervolgens berekenen wij uit de gemiddelden $\bar{y}$ van groep B schattingen p voor P met de formule: $p = \frac{a-\bar{y}}{d}$. De aldus gevonden p-waarden van een bepaalde stof werden tegen de bijbehorende x-waarden uitgezet op waarschijnlijkheidspapier. Op het oog werd vervolgens zo goed mogelijk een rechte lijn door deze punten getrokken. Hieruit konden de ruwe schattingen u_o en m_o worden afgelezen. Het is nu de bedoeling, dat voor iedere schatting een toeslag Δa, Δd enz. wordt berekend, waardoor de schatting wordt verbeterd. Dus $a = a_o + \Delta a$ enz.

Door differentiering van de formule voor het niveau ($Y = a - Pd$) vindt men: $\Delta Y = Y - Y_o = a - dP - (a_o - d_oP_o) = A_o \Delta a + D_o \Delta d + M_o \Delta m + U_o \Delta u$

waarin $A_o = 1$

$D_o = -P_o$

$M_o = \frac{d_o z_o}{u_o}$

$U_o = \frac{d_o t_o z_o}{u_o}$

Y_o, P_o en t_o kunnen volgens hierboven vermelde formules uit de ruwe schattingen a_o, b_o, m_o en u_o worden berekend. z_o is de kansdichtheid voor t_o, die men in een tabel kan opzoeken:

$$z_o = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}t_o^2}$$

Het blijkt dus, dat Y bij benadering liniair kan worden uitgedrukt in de onbekende "regressieconstanten" Δa, Δd, Δm en Δu met de bekende coefficienten A_o, D_o, M_o en U_o als onafhankelijke variabelen en met $\Delta y = \bar{y} - Y_o$ als afhankelijke variabele. Op deze wijze worden de toeslagen Δa enz. als regressiecoefficienten berekend, waardoor verbeterde schattingen worden verkregen. Hiermede wordt het procédé eenmaal herhaald, wat de hierna te vermelden definitieve schattingen opleverde met de gewichten voor m en u en de gewogen kwadratensom $\Sigma w (y - Y)^2$. Deze laatste werd als proef op de som ook steeds nog afzonderlijk berekend op de wijze als hieronder is aangegeven voor het dichlooracetyl-aminosalicylzuur.

De uitkomsten waren nagenoeg aan elkaar gelijk, hetgeen bewijst, dat het benaderingsproces niet verder behoefde te worden voortgezet.

Als a, d, u, m en x gegeven zijn, kan men daaruit als volgt het niveau Y van de logarithmen van de miltgewichten berekenen. Men berekent eerst de normale afwijking $t = \frac{x - m}{u}$.

Vervolgens zoekt men in een tabel de linkse frequentie P op, die met t correspondeert. Tenslotte berekent men Y met de formule: $Y = a - dP$. Als voorbeeld volgt hier de berekening van Y voor de dosis 250 γ voor het dichlooracetyl-aminosalicylzuur:

De waarde voor x bedraagt hier: $x = \log 250 = 2,40$. De beste schattingen voor u en m voor alle proeven met dichlooracetyl-aminosalicylzuur zijn: $u = 1,162$ en $m = 2,005$. Voor t vinden we dus: $t = \frac{2,40 - 2,005}{1,161} = 0,340$. De linkse frequentie hiervoor is volgens een tabel: $P = 0,633$.

De beste schattingen voor a en d voor de betreffende serie zijn: $a = 1,652$ en $d = 0,531$. Hieruit vindt men voor het niveau $Y = 1,652 - 0,531 \times 0,633 = 1,316$.

Vergelijkt men dit met de gemiddelde y-waarde, $\bar{y} = 1,36$, berekend uit 33 waargenomen miltgewichten, dan vindt men een verschil van $\Delta y = \bar{y} - Y = 0,044$ met het gewicht $w = 33$.

Als tweede voorbeeld volgt de berekening van Y voor de A-controlegroep behorende bij dezelfde dosis van dezelfde stof. Hier is $P = 0$, dus $Y = a = 1,652$. De bijbehorende gemiddelde y-waarde, $\bar{y} = 1,63$, berekend uit 24 miltgewichten. Het verschil is dus $\bar{y} - Y = -0,022$ met het gewicht $w = 24$.

Als derde voorbeeld volgt de berekening van Y voor de contrôlegroep C van dezelfde serie:

$Y = a - d = 1,121$

$\bar{y} = 1,09$

$\Delta y = 0,031$ met het gewicht $w = 30$.

In het laatste geval (Groep C) is het gewicht niet gelijk gesteld aan het aantal eieren, maar is het twee maal zo groot genomen (zie pag. 30).

Hieronder volgen alle verschillen, Δy, voor de proeven met het dichlooracetyl-aminosalicylzuur met hun gewichten.

$$s^2 = \frac{\Sigma(y - \bar{y})^2}{n - 1} \qquad \sigma^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \ldots\ldots}{n_1 - 1 + n_2 - 1 + n_3 - 1 \ldots\ldots} = \frac{\Sigma\Sigma(y - \bar{y})^2}{\Sigma_n - m}$$

waarin m het aantal series voorstelt.

Dosis	Groep B		Groep A		Groep	
	w	Δy	w	Δy	w	Δy
20 γ	50	0,008	31	-0,010	45	-0,001
50 γ	22	-0,012	7	0,023	11	0,005
100 γ	30	0,026	18	0,021	21	0,009
250 γ	33	0,044	24	-0,022	15	-0,031
500 γ	8	0,066	14	0,006	6	0,036

Berekent men hieruit de som van de gewogen kwadraten van de afwijkingen, dan vindt men:

$\sigma^2\chi^2 = \Sigma w(\Delta y)^2 = 0,202.$

$\chi^2 = \frac{0,202}{0,057} = 3,52$

Het aantal vrijheidsgraden is gelijk aan het aantal gekwadrateerde verschillen, minus het aantal geschatte constanten. Er zijn hier 15 verschillen. De constanten a en d werden voor ieder van de 5 series afzonderlijk geschat en de constanten m en u eenmaal voor de hele groep. Er werden dus 12 constanten geschat en het aantal vrijheidsgraden $N = 3$. De overschrijdingskans bedraagt ongeveer 40%, zodat het model voor deze groep waarnemingen goed voldoet.

In tabel 28 staan voor alle proeven de beste schattingen voor a, d, m en u, de gewichten w_m en w_u voor m en u en de χ^2 op analoge wijze berekend als hierboven met vermelding van het aantal vrijheidsgraden N.

Voor al e stoffen samen vindt men voor $\chi^2 = 29,54$ met 19 vrijheidsgraden, waarvoor de overschrijdingskans ongeveer 7% bedraagt. Men mag hieruit concluderen, dat de waarnemingen niet in strijd zijn met het gekozen model.

In de tabel staan ook de gewogen gemiddelden $\bar{m} = \Sigma w_m : \Sigma w_m = 2,032$ en $\bar{u} = \Sigma w_u u : \Sigma w_u = 0,515$ van het hele materiaal vermeld. Dit heeft zijn nut, omdat de veronderstelling, dat m en u voor alle stoffen gelijk zijn, niet in strijd is met de waarnemingen. Als toets voor de verschillen tussen de m-waarden vonden wij namelijk $\chi^2 = w_m(m - \bar{m})^2 : \sigma^2 = 9,65$, met 7 vrijheidsgraden. De overschrijdingskans bedraagt hier 22%. Voor de verschillen tussen de u-waarden bedroeg $\chi^2 = w_u(u - \bar{u})^2 : \sigma^2 = 4,612$ eveneens met 7 vrijheidsgraden. De overschrijdingskans bedraagt 70%. De verschillen zijn niet significant.

Onze aandacht is gevallen op het feit, dat zulke uiteenlopende stoffen als streptomycine, J.M.H. en P.A.S. met zijn derivaten practisch uniform verlopende dosiswerkingscurven bezitten. De curven hebben niet alleen hetzelfde model, maar vallen ook binnen de toevalsfouten samen. De verschillen in moleculairgewicht schijnen hierbij van ondergeschikt belang te zijn

Conclusie

Als resultaat van de statistische bewerking van de uitkomsten van een aantal verbindingen, die bij een aantal verschillende concentraties met behulp van de kippenembryoproef werden

onderzocht, kon worden aangetoond, dat een sigmoide vorm van de dosiswerkingscurve niet in tegenspraak was met de waarnemingen. De vorm en het niveau van de x-waarden van de verschillende dosiswerkingscurven bleken onderling niet significant te verschillen.

Gelijk wij op pag. 21 reeds opmerkten, kan men, indien een aantal verschillende verbindingen eenzelfde dosiswerkingscurve bezitten, volgens algemene ervaringen in de biologie verwachten, dat alle andere stoffen, indien zij althans geen andere complicerende eigenschappen bezitten, onder overeenkomstige proefcondities een dosiswerkingscurve zullen hebben van dezelfde vorm.

Men mag hieruit de conclusie trekken, dat men van een nieuwe verbinding slechts één punt van de curve nauwkeurig behoeft te bepalen om de curve te kunnen berekenen. Deze conclusie vereenvoudigt de proefopstelling in belangrijke mate.

Als criterium voor de werkzaamheid van een verbinding werd de halfwerkzame dosis gekozen. Voor de onderzochte stoffen bedroeg de halfwerkzame dosis gemiddeld 108 γ per ei (Log 108 = 2,032).